

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE PÉPTIDOS  
PREBIÓTICOS PLAUSIBLES Y SU INTERACCIÓN  
CON ÁCIDOS NUCLEICOS, ARENOS Y  
NUCLEÓTIDOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

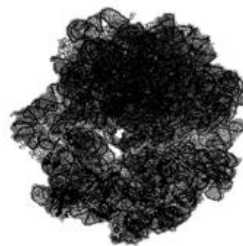
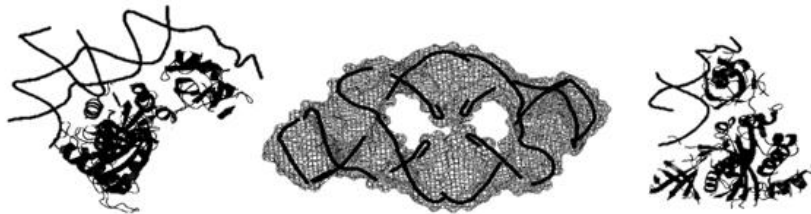
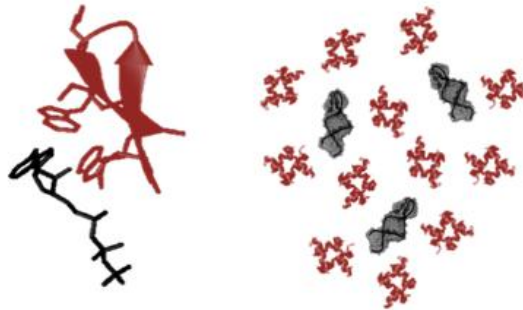
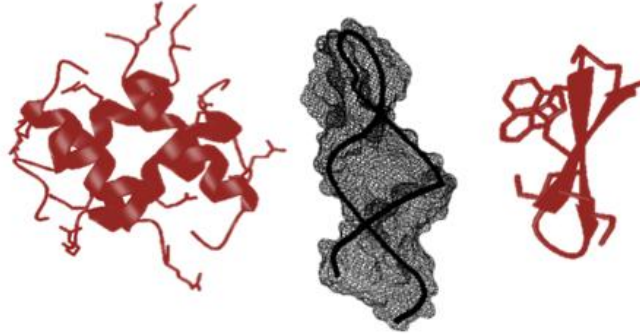
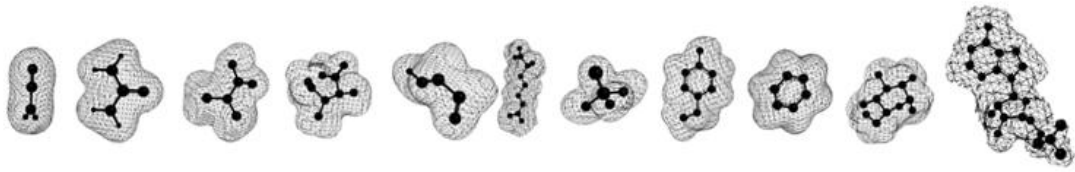
**Fernando Díez García**

**Bajo la dirección de los doctores**

**Douglas V. Laurents  
Carlos González Ibáñez**

**Madrid, 2013**

# Análisis Conformacional de Péptidos Prebióticos Plausibles y su Interacción con Ácidos Nucleicos, Arenos y Nucleótidos



**Fernando Diez García**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE PÉPTIDOS PREBIÓTICOS PLAUSIBLES Y  
SU INTERACCIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS, ARENOS Y NUCLEÓTIDOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR**  
**Fernando Díez García**

**Directores: Douglas V. Laurents**  
**Carlos González Ibáñez**

**Departamento de Química Física Biológica**  
**Instituto de Química-Física Rocasolano**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**



**Madrid, 2012**



# ÍNDICE

Pág.

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>11</b>
<b>SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1.1. Abiogénesis y moléculas prebióticas .....	21
1.2. El “RNA World” y la evolución de una teoría .....	25
1.3. “RNA-peptide World”: una alternativa viable .....	26
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3. ESTUDIOS PREVIOS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Péptidos KIA: secuencias presuntamente prebióticas ricas en Lys.....	35
3.2. Péptidos KIA7: tetrameros helicoidales, unión y degradación de RNAs ....	36
3.3. Química prebiótica y síntesis peptídica: Arg frente a Lys .....	39
<b>4. RIA7 .....</b>	<b>41</b>
4.1. Caracterización estructural: conformación “four helix bundle” .....	44
4.1.1. CD: estructuras helicoidales de estabilidad similar a la de péptidos con Lys .....	45
4.1.2. RMN: orientación antiparalela de las hélices en la conformación tetramérica.....	47
4.1.3. Intercambio H/D y los residuos terminales más expuestos al medio .....	49
4.1.4. Dinámica molecular para la obtención de la estructura tridimensional de RIA7....	51
4.2. Interacción con RNAs y formación de agregados .....	52
4.2.1. PAGE vertical y horizontal en presencia de cationes divalentes y EDTA .....	53
4.2.2. Detección de agregación mediante espectrometría de fluorescencia .....	57
4.2.3. CD: interacción con RNAs de estructura definida.....	60
4.2.4. Monitorización por RMN de las moléculas de RNA libres y en los aductos.....	63
4.3. Residuos aromáticos terminales en el diseño de péptidos .....	65

<b>5. KIA7I .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1. Caracterización estructural: tetrameros y extremos C-terminales libres...</b>	<b>69</b>
5.1.1. Poca dispersión en espectros de RMN .....	69
5.1.2. Dinámica molecular: extremos C-terminales con estructura aleatoria.....	72
<b>5.2. Interacción con arenos, predominantemente benceno y fenol.....</b>	<b>74</b>
5.2.1. Espectroscopia de RMN: NOEs intermoleculares.....	74
5.2.2. Fluorescencia del ANS: conformaciones parcialmente desplegadas .....	78
<b>6. KIA<math>\beta</math> .....</b>	<b>83</b>
<b>6.1. Diseño estructural y funcional.....</b>	<b>86</b>
<b>6.2. Determinación estructural: horquilla <math>\beta</math> con giro de tipo I'.....</b>	<b>88</b>
6.2.1. RMN 1D: formas plegada y desplegada de los péptidos KIA $\beta$ .....	89
6.2.2. CD: apilamiento del par WW y diferencias de plegamiento según pH y T .....	91
6.2.3. Determinación estructural de KIA $\beta$ W mediante RMN.....	92
6.2.4. Cálculo de la estructura mediante dinámica molecular .....	95
<b>6.3. Propiedades de interacción con NTPs de manera específica .....</b>	<b>98</b>
6.3.1. RMN 1D: estequiometría 1:1 para los complejos KIA $\beta$ W·ATP .....	98
6.3.2. Espectros de fluorescencia propios de fluoróforos situados en la superficie .....	99
6.3.3. RMN: NOEs intermoleculares y desplazamiento de señales según pH y T .....	104
<b>7. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
<b>8.1. Síntesis de RNAs.....</b>	<b>123</b>
8.1.1. Síntesis de la polimerasa del fago T7 .....	123
8.1.2. Síntesis de RNAs mediante transcripción <i>in vitro</i> .....	126
<b>8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) .....</b>	<b>128</b>
8.2.1. PAGE en condiciones desnaturalizantes .....	129
8.2.2. PAGE no desnaturalizante .....	130
8.2.3. Métodos de Tinción .....	131

<b>8.3. Dicroísmo circular (CD)</b>	<b>132</b>
<b>8.4. Espectrometría de fluorescencia</b>	<b>134</b>
8.4.1. Dispersión de luz	136
8.4.2. Fluorescencia del ANS	137
8.4.3. Apantallamiento	138
<b>8.5. Espectroscopia de RMN</b>	<b>139</b>
8.5.1. Espectroscopia monodimensional (1D)	142
8.5.2. Espectroscopia multidimensional	143
8.5.3. Asignación de espectros	145
<b>8.6. Procedimientos de dinámica molecular (MD)</b>	<b>145</b>
8.6.1. CYANA	146
8.6.2. AMBER	147
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>149</b>
<b>10. APÉNDICE</b>	<b>165</b>





A mis padres, amigos y, en especial, a Paula



# AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a Carlos González Ibáñez y Douglas V. Laurents por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ellos dentro de un grupo tan consolidado en el ámbito de la RMN y haber podido colaborar en proyectos como los que aquí se detallan. Ha sido para mí una suerte contar con las enseñanzas de Jorge Santoro Said y considero un privilegio el haber estado respaldado en todo momento por la sabiduría y los conocimientos en el mundo de la biofísica de Manuel Rico Sarompas, Marta Bruix Bayés, M<sup>a</sup> Ángeles Jiménez López, José Manuel Pérez Cañadillas, Irene Gómez Pinto, Avijit Chakrabartty y M<sup>a</sup> Flor García Mayoral. Quiero agradecer también a David Pantoja Uceda su paciencia con mis errores de novato, sus más que correctas indicaciones y sus útiles aunque, en ocasiones, prolijos consejos. Por último, me gustaría darle las gracias, de corazón, a Douglas. Gracias por inculcar en mí todos esos buenos valores, esa vocación y, en definitiva, toda esa CIENCIA tan meticulosa y con tan buen hacer. Los chistes y los pinchos son también de agradecer.

Este trabajo ha sido financiado por una beca de Formación de Personal Investigador (BES-2008-007552) adjudicada por el suprimido Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y asociada a los proyectos CTQ2007-68014-C02-02 y CTQ 2010-21567-C02-02, en el Instituto de Química-Física “Rocasolano”, adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQFR-CSIC).

# SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de fuerza atómica ( <i>atomic force microscopy</i> )
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico
APS	Persulfato de amonio ( <i>ammonium persulfate</i> )
ARM	Dominio rico en argininas ( <i>arginine-rich motif</i> )
BPB	Azul de bromofenol ( <i>bromophenol blue</i> )
DC	Dicroísmo circular ( <i>circular dichroism</i> )
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
MALDI-TOF-MS	Espectrometría de masa con desorción/ionización inducida por láser, asistida por una matriz y con analizador de tiempo de vuelo ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> )
MD	Dinámica molecular ( <i>molecular dynamics</i> )
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
PDB	Base de datos de proteínas ( <i>protein data bank</i> )
PEG	Polietilenglicol
PMDB	Base de datos de modelos de proteínas ( <i>protein model data base</i> )
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
PNA	Ácido nucleico peptídico ( <i>peptide nucleic acid</i> )
RMSD	Desviación cuadrática media ( <i>root mean square deviation</i> )
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
TEMED	Tetrametiletilendiamina
$\delta$	Desplazamiento químico
$\Theta$	Elipticidad molar
$\tau_m$	Tiempo de mezcla

# FIGVRAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Cromatografía en papel del experimento Miller-Urey .....	22
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de síntesis de ribonucleótidos de pirimidina.....	24
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del "RNA-peptide World" .....	31
<b>Figura 4.</b> Imagen de AFM de las fibras helicoidales de KIA13 .....	35
<b>Figura 5.</b> Espectros de CD representativos de las variantes de péptidos KIA.....	37
<b>Figura 6.</b> Modelos estructurales de péptidos KIA7 con residuos C-terminales aromáticos .....	38
<b>Figura 7.</b> Gel Urea-PAGE al 20% con mezclas de reacción de péptidos KIA7 y RNA $\tau$ 10 .....	39
<b>Figura 8.</b> Tipos de interacción proteína-RNA según aminoácidos .....	43
<b>Figura 9.</b> Experimentos de CD de muestras de RIA7.....	46
<b>Figura 10.</b> Región HN de espectros 2D $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY y NOESY de RIA7.....	48
<b>Figura 11.</b> Región $\alpha$ del espectro 2D $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC de RIA7 .....	48
<b>Figura 12.</b> Análisis conformacional de desplazamientos químicos para RIA7 .....	49
<b>Figura 13.</b> Espectros de RMN del intercambio H/D de RIA7 .....	50
<b>Figura 14.</b> Gráficos de intercambio H/D para protones $^1\text{HN}$ del péptido RIA7.....	51
<b>Figura 15.</b> Modelo estructural de RIA7 .....	52
<b>Figura 16.</b> Urea-PAGE de muestras con RIA7 + $\tau$ 10 + cationes divalentes o EDTA.....	54
<b>Figura 17.</b> Urea-PAGE de muestras con RIA7 + $\tau$ 10 + RNasa A .....	55
<b>Figura 18.</b> PAGE horizontal y vertical en condiciones nativas de RIA7 con RNAs.....	56
<b>Figura 19.</b> Espectros de fluorescencia de A) RIA7 + $\tau$ 10 y B) RIA7 + $\tau$ 10 + KCl.....	58
<b>Figura 20.</b> Representación del comportamiento de RIA7 en presencia de $\tau$ 10 y sal.....	60
<b>Figura 21.</b> Espectros UV de CD de RIA7 en presencia de distintos RNAs .....	61
<b>Figura 22.</b> Espectros UV de CD de RIA7 + $\tau$ 10 a diferentes relaciones molares .....	63
<b>Figura 23.</b> Espectros de RMN 1D $^1\text{H}$ de RIA7 + $\tau$ 10 + NaCl .....	64
<b>Figura 24.</b> Espectros de 2D de RMN TOCSY, NOESY y HSQC de KIA7I.....	71
<b>Figura 25.</b> Modelo estructural de KIA7I: A) imagen estereoscópica y B) conformaciones representativas del extremo C-terminal .....	73
<b>Figura 26.</b> Regiones de los espectros de RMN 1D $^1\text{H}$ y 2D NOESY de muestras de KIA7I con benceno o fenol .....	75
<b>Figura 27.</b> Espectros de RMN 1D $^1\text{H}$ y 2D NOESY de KIA7I + benceno o fenol .....	76
<b>Figura 28.</b> Espectros de RMN de KIA7W, A $\beta$ <sub>1-40</sub> y HEWL en presencia de benceno.....	78

<b>Figura 29.</b> Resultados de fluorescencia del ANS para diferentes péptidos KIA7 .....	<b>79</b>
<b>Figura 30.</b> Resultados de fluorescencia del ANS para KIA7I + arenas .....	<b>81</b>
<b>Figura 31.</b> Resultados de fluorescencia del ANS para KIA7I + benceno + sal.....	<b>82</b>
<b>Figura 32.</b> Representación esquemática de la secuencia de los péptidos KIA $\beta$ .....	<b>86</b>
<b>Figura 33.</b> Espectros 1D $^1\text{H}$ de péptidos KIA $\beta$ .....	<b>90</b>
<b>Figura 34.</b> Análisis conformacional de los $\delta$ para $^1\text{H}\alpha$ de los péptidos KIA $\beta$ .....	<b>90</b>
<b>Figura 35.</b> Espectros de CD de KIA $\beta$ W a diferentes pHs y temperaturas.....	<b>91</b>
<b>Figura 36.</b> Espectros de RMN 2D TOCSY y NOESY de KIA $\beta$ W .....	<b>92</b>
<b>Figura 37.</b> Curvas de titulación de His 1, His 12 y Lys 4 de KIA $\beta$ W .....	<b>93</b>
<b>Figura 38.</b> Modelo estructural calculado para KIA $\beta$ W.....	<b>96</b>
<b>Figura 39.</b> Diagramas de superficie del potencial electrostático de KIA $\beta$ W.....	<b>97</b>
<b>Figura 40.</b> Diagrama de Job de KIA $\beta$ W + ATP .....	<b>99</b>
<b>Figura 41.</b> Resultados de fluorescencia para KIA $\beta$ W según [ATP] y pH .....	<b>101</b>
<b>Figura 42.</b> Diagrama de apantallamiento de la fluorescencia del par WW de KIA $\beta$ W.....	<b>102</b>
<b>Figura 43.</b> Representación esquemática de la unión de KIA $\beta$ W con los diferentes NTPs.....	<b>103</b>
<b>Figura 44.</b> Espectros 1D $^1\text{H}$ de KIA $\beta$ W + ATP y $\Delta\delta$ en función de la temperatura.....	<b>105</b>
<b>Figura 45.</b> Región del par WW en un espectro 2D $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC de KIA $\beta$ W con y sin ATP .....	<b>106</b>
<b>Figura 46.</b> Espectros 2D NOESY y TOCSY de KIA $\beta$ W + ATP.....	<b>107</b>
<b>Figura 47.</b> Representación esquemática de la interacción entre KIA $\beta$ W y ATP.....	<b>108</b>
<b>Figura 48.</b> Representación gráfica de los ensayos de alineamiento entre KIA7Y y KIA7Y .....	<b>114</b>
<b>Figura 49.</b> Gel de SDS-PAGE para monitorizar la purificación de la T7 RNAPol.....	<b>125</b>
<b>Figura 50.</b> Espectros de CD representativos de diferentes estructuras peptídicas.....	<b>134</b>
<b>Figura 51.</b> Protocolo de preparación y optimización de las muestras de KIA7I + benceno.....	<b>141</b>
<b>Figura 52.</b> Secuencia general de pulsos de un experimento de RMN 2D .....	<b>143</b>

*“El hombre sabe al fin que está solo en la inmensidad indiferente del universo, de donde ha surgido por casualidad. Su deber, como su destino, no está escrito en ninguna parte”.*

**Jacques Monod**





# RESUMEN

La hipótesis del “RNA World” es, a día de hoy, la propuesta más aceptada por la comunidad científica para tratar de arrojar algo de luz sobre los comienzos de la vida celular en nuestro planeta. Define la síntesis prebiótica de ciertos componentes primordiales, su evolución bioquímica y las propiedades que estos hubiesen otorgado a los primeros organismos, llegando a suponer ventajas fundamentales para su supervivencia y así, más adelante, dar origen a toda la biodiversidad que conocemos actualmente. Mediante estudios basados en rutas de síntesis, distintos modelos estructurales y ensayos de interacción con moléculas conocidas en el presente, se intentan elucidar estas incógnitas originales para que puedan ser aplicables y servir de utilidad en la bioquímica moderna. En este sentido, haciendo uso de técnicas como la RMN, fluorescencia, CD y PAGE entre otras, este trabajo representa un esbozo sobre el estudio de algunas de estas posibles moléculas, haciendo hincapié en pequeños péptidos posiblemente prebióticos, sus propiedades estructurales y su actividad frente a diferentes tipos de RNAs y sus unidades moleculares, el material genético primordial por excelencia. Como resultado hemos podido conocer la estructura, plegamiento y actividad de estas moléculas; hemos identificado cuáles son los residuos esenciales para su estabilidad y hemos tratado de mejorar sus propiedades de interacción con pequeños ligandos nucleotídicos. En definitiva, hemos querido hacer patente la posibilidad de una coexistencia entre péptidos y RNAs en las etapas definidas por la hipótesis de un presunto “RNA-peptide World”. Estos estudios han servido al mismo tiempo para extraer numerosas conclusiones adicionales respecto al diseño de péptidos y nos han permitido también conocer con más detalle los fenómenos de interacción entre proteínas y pequeños ligandos, tales como RNAs, NTPs o arenos.



## **1. INTRODUCCIÓN**

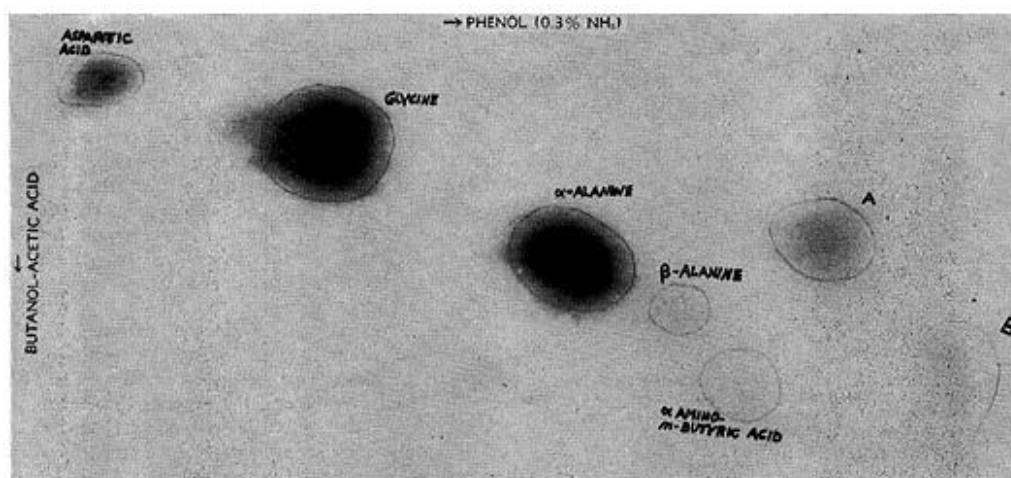


Es inusual encontrar un libro sobre bioquímica general que no comience abordando el tema sobre el origen de la vida y defina a continuación cómo dicha disciplina estudia los mecanismos que tienen lugar en las células que componen los organismos vivos. Todos y cada uno de estos procesos son fruto de la interacción entre un enorme abanico de biomoléculas y moléculas inorgánicas, formadas a su vez por componentes elementales, cuyo comportamiento se encuentra definido por una serie de leyes fisicoquímicas. Existe, por tanto, una inevitable relación entre la vida y las leyes que rigen este universo en su mayoría inerte.

### **1.1. Abiogénesis y moléculas prebióticas**

¿Cuáles fueron los procesos por los que tuvo lugar la formación de las primeras moléculas orgánicas? Esta pregunta, tras el establecimiento del concepto de célula (Hooke 1665) y el descubrimiento de la existencia de las enzimas (Buchner 1897) fue adquiriendo un gran protagonismo, especialmente durante el siglo XX, gracias a los avances tecnológicos que han ido dando lugar a nuevos hallazgos y técnicas empleadas en la actualidad. ¿Cuáles fueron los compuestos primigenios que posibilitaron la posterior aparición de complejos supramoleculares estables y con propiedades autorreplicativas durante los orígenes de la vida en nuestro planeta? Desde la aparición del concepto de “sopa primitiva” propuesto por Oparin y Haldane en los años 20 (Oparin 1924; Haldane 1929) y los experimentos de Miller y Urey (Urey 1952; Miller 1953), durante los años 50, esta cuestión ha sido un motivo de estudio inherente a la propia bioquímica. Las principales teorías se centran en la búsqueda de unas funciones o propiedades determinadas para estas moléculas y, más en concreto, en aquellas características que se consideran esenciales en las primeras etapas de la evolución prebiótica: estabilidad, interacción, polimerización, autorreplicación y, finalmente, función. La mayoría de los modelos propuestos tienen en común la búsqueda de las condiciones de reacción propicias para que tuviesen lugar determinados mecanismos químicos que propiciasen la aparición de moléculas orgánicas complejas estables, que tuviesen las propiedades mencionadas. Por ello, los estudios realizados al respecto se centran en las principales unidades estructurales de las que se componen los sistemas biológicos actuales: ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares y/o lípidos.

Ya en el célebre experimento ideado por Miller, teniendo en cuenta las circunstancias ambientales definidas en la atmósfera primigenia propuesta por Urey, al hacer reaccionar  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , hirviendo la mezcla y administrando descargas durante una semana para promover la formación de radicales, se pudieron detectar trazas de aminoácidos mediante cromatografía en papel. Se encontraron principalmente Gly, Asp, Ala y un derivado del ácido aminobutírico, relacionado directamente con el metabolismo de Ser y Glu (Figura 1). Durante los años siguientes se realizaron experimentos similares aprovechando los avances científicos y tecnológicos desarrollados hasta la fecha, con el objeto de llevar a cabo la síntesis de moléculas orgánicas complejas en determinadas



**Figura 1.** Cromatografía en papel en la que se indica la presencia de Asp, Gly, Ala y ácido  $\alpha$  amino-n-butírico, entre otras especies no identificadas (A y B), corrida primero en una disolución acuosa de ácido acético y butanol y después en fenol. El revelado que permitió observar los diferentes aminoácidos se realizó con ninhidrina. La certeza en la identificación de ácido  $\alpha$  amino-n-butírico es poco clara debido a que se observan puntos pero de forma muy débil (Miller 1953).

condiciones. Es por ello que la lista de compuestos que podían ser obtenidos de forma viable en un supuesto mundo prebiótico iba aumentando año tras año, al igual que las posibles condiciones en las que estos podían surgir. Entre los modelos iniciales destaca el experimento de Matthews and Moser, en el que se empleó una atmósfera menos reductora formada por  $\text{HCN}$ ,  $\text{NH}_3$  y vapor de agua; como resultado de la reacción se obtuvieron péptidos de hasta 12 residuos, además de varios aminoácidos no observados en experimentos anteriores. Recientemente, el mismo procedimiento llevado a cabo por Miller 45 años atrás fue reproducido por triplicado por el grupo de Bada, empleando los mismos compuestos de partida y aplicando descargas eléctricas durante una semana haciendo uso de un generador Tesla (Johnson et al. 2008) o simulando que esta atmósfera primigenia hipotética era también rica en  $\text{H}_2\text{S}$  (Parker et al. 2011); los resultados fueron analizados mediante MALDI-TOF-MS y HPLC con detección de fluorescencia en el rango de luz ultravioleta. Así, a lo largo de los experimentos realizados desde entonces, se ha demostrado que la síntesis *de novo* de

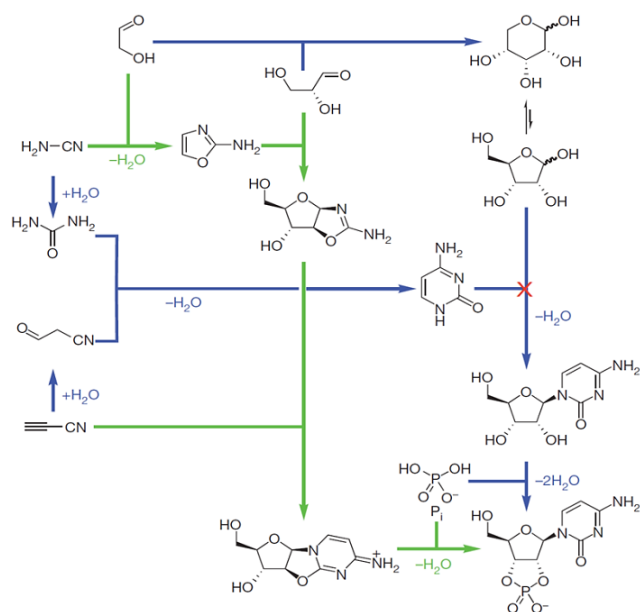
todos los aminoácidos canónicos o naturales, a excepción de Trp, Asn y Gln, es perfectamente plausible en una atmósfera reductora formada por compuestos sencillos como  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCN}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , sobre la cual se aplican descargas eléctricas. Adicionalmente, como ya se ha mencionado, se ha detectado también la aparición de pequeños péptidos de hasta 12 residuos, así como la presencia de aminoácidos no estándares que hubiesen podido ser precursores de otros menos estables o provenir del metabolismo de estos, como es el caso de la Orn, posible precursor de Arg, Glu y Pro.

Es interesante señalar que en la formación de aminoácidos en condiciones prebióticas existe predilección por la aparición de formas L sobre las formas D durante los procesos de síntesis. Ello daría pie a pensar que esta autocatálisis asimétrica natural pudo originar la homoquiralidad presente en los compuestos aminoacídicos que conocemos actualmente, la cual a su vez influyó probablemente sobre la quiralidad de los azúcares que forman parte de los ácidos nucleicos. Esta enantioselectividad, que parece ser clave tanto en la estructura como en la funcionalidad de las macromoléculas contemporáneas, es otro de los misterios que rodean al origen de la vida en términos moleculares y siembra dudas sobre la exclusividad del RNA como compuesto representativo durante estos primeros estadios (Podlech 2001; Bielski and Tencer 2007; Breslow and Cheng 2010).

Por otro lado, experimentos similares a los descritos al comienzo de este apartado tampoco arrojaban luz sobre el origen de los azúcares y las nucleobases que forman parte de los nucleótidos. Los mecanismos propuestos para la síntesis *de novo* tanto de ribosa como de lípidos se basaba en el uso de glicerol obtenido a partir de formaldehído (Weber 1992). En cuanto a las bases nitrogenadas, las principales hipótesis se centraban en el uso de formamida y su precursor, cianuro de hidrógeno, como compuestos de partida. A pesar de la dificultad que hubiese entrañado su formación en la atmósfera primitiva propuesta, las reacciones de síntesis también podrían haber ocurrido en condiciones hidrotermales plausibles o sobre superficies salinas con catalizadores inorgánicos tales como fosfatos, carbonatos o silicatos (Oro 1961; Sanchez et al. 1967; Ferris et al. 1978; Ferris 1993; Huber and Wächtershäuser 2006; Plankensteiner et al. 2006; Saladino et al. 2011). Aun con todo, el rendimiento de las reacciones de síntesis de ribosa, de nucleobases o de la posterior condensación de ambos para dar lugar a los nucleósidos era muy limitado, sobre todo en el caso de compuestos con bases nitrogenadas pirimidínicas. Es por ello que recientemente se propuso un mecanismo alternativo en el que, en lugar de buscar la síntesis de azúcares y nucleobases por separado para intentar unirlos después, se optó por obtener intermedios de reacción que ya incluyesen el enlace crítico y no fuese necesaria la condensación de ambos compuestos por separado. En este modelo se lleva a cabo una reacción de síntesis empleando, como reactivos iniciales: cianamida, cianoacetileno, gliceraldehído y glicolaldehído en disolución acuosa y en presencia de fosfato inorgánico. Es este fosfato inorgánico el que, gracias a sus propiedades sirve a la vez como elemento tamponante y catalizador, favoreciendo



la obtención de los nucleótidos monofosfato, pudiendo además haber participado en la formación de AMP, ADP y ATP (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática del mecanismo de síntesis de pirimidinas. En azul se observan los pasos seguidos en un modelo en el que la condensación entre la base nitrogenada y la ribosa no era factible debido a las propias condiciones de reacción. En verde, el modelo propuesto por Sutherland y sus colaboradores para obtener nucleótidos monofosfato estables en condiciones de reacción, a pH neutro y con un rendimiento aceptable. Del mismo modo, se han propuesto rutas similares para la síntesis de nucleótidos de purina (Powner et al. 2009; Powner et al. 2010).

Centrándonos en la búsqueda de las condiciones que hubiesen podido dar origen a estos componentes prebióticos se han postulado diversas teorías, cada una de ellas con más o menos partidarios y detractores. Sin tener en cuenta el origen extraterrestre de la vida o panspermia (Arrhenius 1903; Pizzarello 2007), que no trata directamente el origen de la vida en la Tierra sino que lo “traslada”, nos encontramos con que cada una de las hipótesis más defendidas nos ofrece conceptos muy interesantes. Tener en cuenta los aspectos más importantes de cada uno de ellos servirá de ayuda a la hora de unificar un modelo no excluyente. Por ejemplo, hay teorías que defienden la importancia de las superficies minerales como reservorio de agentes reductores, cofactores o catalizadores en las reacciones de síntesis de compuestos orgánicos complejos, a la vez que sirven como ambiente estable que promueve los diferentes procesos de reacción, ya sea por fenómenos de adsorción, interacción electrostática, apilamiento o favoreciendo la polimerización de monómeros (Bernal 1949; Wachtershauser 1992; Lambert 2008; Kawamura et al. 2011). Otras hipótesis apoyan la idea de que los lípidos fueron las primeras moléculas orgánicas estables con capacidad autorreplicativa y que las vesículas formadas pudieron servir como reactores para la química abiótica (Segre and Lancet 2000; Segre et al. 2001). Basándose en el bajo rendimiento y la inestabilidad de los oligómeros y polímeros de algunos de los modelos de síntesis propuestos, también existe gran aceptación en cuanto al origen de la vida en condiciones hidrotermales (Hennet et al. 1992; Marshall 1994; Andersson et al. 2000; Aubrey et al. 2009). No obstante, los

ribonucleótidos de una tierra primordial no hubiesen soportado estas condiciones a menos que formase polímeros o existiese algún tipo de mecanismo para evitar su degradación (Kawamura et al. 2005). Surge así la teoría más aceptada actualmente, la teoría del “RNA World”, la cual abordaremos a continuación teniendo presente que la mayoría de ideas propuestas por el resto de hipótesis no son necesariamente incompatibles.

## 1.2. El “RNA World” y la evolución de una teoría

Actualmente, la mayoría de descubrimientos científicos realizados al respecto coinciden en reconocer al RNA como la primera biomolécula capaz de formar estructuras complejas estables, con propiedades catalíticas y con capacidad de autorreplicación. Parece, por tanto, que podríamos estar ante el constituyente primordial de los primeros entes vivos hace cuatro mil millones de años (Schidrowski 1988; Gesteland et al. 2006; Bywater 2012). O eso es, al menos, lo que afirma la hipótesis del “RNA World”, la más aceptada hoy en día para tratar de explicar cómo tuvo lugar este fenómeno o conjunto de fenómenos de tal transcendencia. Cuando este término fue acuñado por Walter Gilbert en 1986 (Gilbert 1986), el RNA ya parecía tener un papel crucial en las teorías sobre el origen de la vida desde antes de la década de los 70 (Crick 1968; Orgel 1968). Es posible que hasta hace 30 años tales conceptos careciesen de los apoyos empíricos suficientes, pero gracias a descubrimientos tan relevantes como la existencia de las ribozimas (Kruger et al. 1982; Guerrier-Takada et al. 1983) o las rutas de síntesis *de novo* de cadenas de RNA ideadas más recientemente (Powner et al. 2009), esta hipótesis cada vez ha ido cobrando más fuerza y evolucionando del mismo modo que las moléculas que intenta describir. Por ello, a día de hoy, se habla incluso de dos ramas de esta hipótesis del mundo del RNA: la primordial y la contemporánea (Cech 2011). La primera, habla hipotéticamente de una era donde el RNA tenía capacidades funcionales a la vez que servía de almacén para la información genética. La segunda, nos propone un mundo prebiótico en el que las moléculas compuestas por ribonucleótidos tenían funciones más específicas, al igual que ocurre con los sistemas biológicos actualmente, participando en catálisis de reacciones bioquímicas, traducción de mRNAs, regulación de la expresión génica e incluso protección frente a agentes externos (ribozimas, riboswitches, microRNAs...) (Ban et al. 2000; Collins et al. 2009; Wang et al. 2010).

### 1.3. **“RNA-peptide World”: una alternativa viable**

En la hipótesis del mundo del RNA se defiende que los ácidos ribonucleicos fueron moléculas esenciales para la evolución prebiótica, en parte por ser capaces de catalizar la polimerización de aminoácidos y la unión de pequeños péptidos. Basándonos en los modelos de síntesis prebiótica descritos anteriormente, péptidos y aminoácidos serían unos candidatos más que aceptables para coexistir junto a los RNAs en un mundo primigenio, surgiendo de forma casi inevitable el concepto de “RNA-peptide World”. Junto con este término se postula la idea de que la cohabitación entre aminoácidos y ribonucleótidos en condiciones supuestamente prebióticas fue relevante para la catálisis de la replicación y polimerización de ambos compuestos, posibilitando así la formación de las ribonucleoproteínas y complejos macromoleculares que más tarde pudiesen llegar a favorecer las condiciones esenciales para la aparición de un proto-ribosoma, para finalmente dar lugar al mundo del DNA que hoy conocemos (Di Giulio 1997; Collins et al. 2009; Kurland 2010).

Numerosos estudios atribuyen las propiedades autocatalíticas y autorreplicativas propias de los RNAs (Wochner et al. 2011) también a péptidos sencillos (Lee et al. 1996; Severin et al. 1997; Issac et al. 2001; Issac and Chmielewski 2002). Se conocen procesos catalíticos entre ácidos ribonucleicos y péptidos, que permiten favorecer la interacción, replicación y la polimerización de ambos (Illangasekare and Yarus 1999; Matsumura et al. 2003; Tamura and Schimmel 2003) e incluso, en algunos trabajos, se va más allá y se habla de un “PNA World” previo al resto de etapas, con los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) como molécula clave (Nielsen 2007): una suerte de híbridos diseñados inicialmente para ser usados en terapia génica, en los que el esqueleto de azúcar-fosfato es sustituido por residuos aminoacídicos unidos por enlaces peptídicos, haciéndolos más estables que los RNAs.

Así mismo, tal y como defienden alguna de las teorías expuestas, lípidos y azúcares surgirían en este mundo primigenio durante alguna de las etapas mencionadas y ambos se encontrarían directamente relacionados con los péptidos prebióticos (Burroughs et al. 2012); según parece, la flexibilidad estructural que los caracteriza hubiese sido crucial en la evolución química de los primeros compuestos prebióticos hacia la formación de macromoléculas mejor adaptadas a las características del medio. A su vez, estas macromoléculas supondrían evidentes ventajas para la supervivencia de los proto-organismos. Es por ello que surgen teorías como la del mundo de las fibras de amiloides y ácidos nucleicos (“ANA World”), en la que los ácidos nucleicos reclutarían péptidos mediante la interacción de las cargas con los grupos fosfato y darían lugar a la formación y crecimiento de fibras de amiloide, cuyas estructuras secundarias, al disociarse, promoverían la

hibridación y replicación de las cadenas nucleotídicas. Las vesículas formadas a partir de lípidos también podrían cumplir un papel contendor y de compartimentación de dichos procesos, para después permitir la separación entre macromoléculas con diferentes capacidades (elongación, replicación, etc.) (Braun et al. 2012).

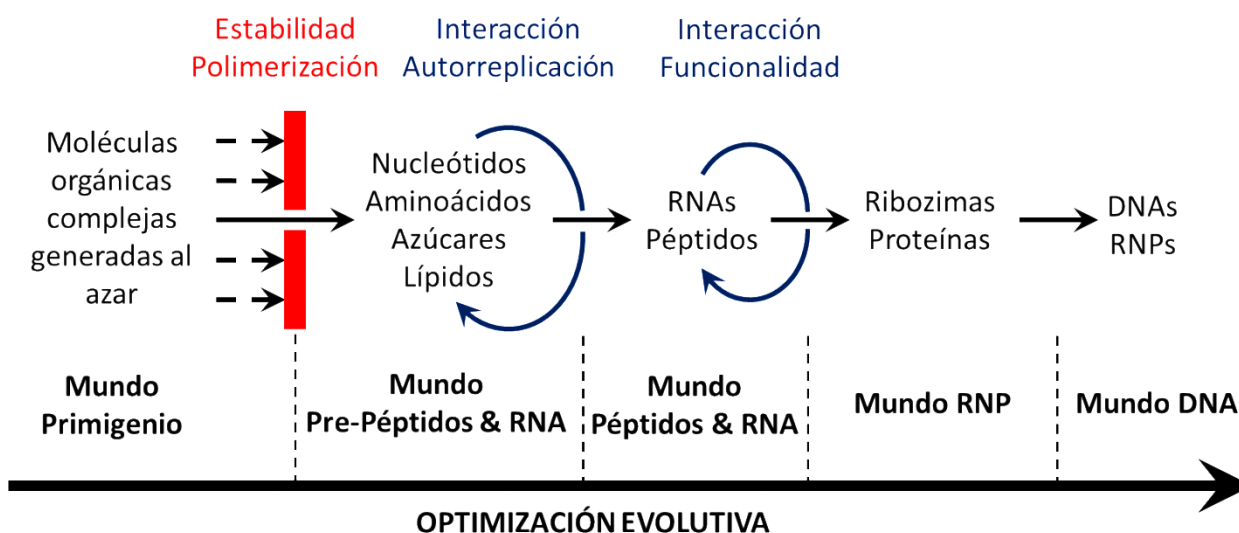
En definitiva, se hace patente que todos estos descubrimientos giran en torno a la idea de un más que de sobra aceptado mundo prebiótico, cuyas etapas iniciales tienen como principales protagonistas a los aminoácidos, péptidos y ácidos ribonucleicos. Es por eso que durante este trabajo se ha tratado de conocer mejor cómo interaccionan entre sí y cuáles serían las propiedades estructurales y funcionales de los complejos formados.



## **2. OBJETIVOS**



En este trabajo se pretende comprobar la viabilidad de la coexistencia entre péptidos y RNAs en un plausible ambiente prebiótico. Centrándonos en la evolución de estas proto-biomoléculas, nuestros objetivos experimentales se han basado en las ideas de la línea más contemporánea de la hipótesis del “RNA World” y en los conceptos planteados por Di Giulio (Di Giulio 1997). Hemos querido poner a prueba la hipótesis de la generación de nucleótidos y aminoácidos en las condiciones extremas de un ambiente prebiótico, que más tarde podrían haber dado lugar a la coexistencia de ácidos ribonucleicos y péptidos. Estas moléculas, al ser capaces de interactuar entre sí, permitirían después la formación de los complejos que supondrían una ventaja evolutiva para promover la supervivencia de los organismos de ese hipotético mundo primigenio (de Vladar 2012) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la evolución de nuestra idea de “RNA-peptide world”, desde un mundo primigenio hasta nuestros días. De una mezcla de compuestos orgánicos, formados bajo condiciones putativamente prebióticas, solo aquellas moléculas con estructuras estables capaces de polimerizar habrían superado los fuertes requisitos evolutivos de esas primeras etapas; el desarrollo de propiedades de autorreplicación y la interacción entre ellos permitirían después catalizar la formación de moléculas más complejas con capacidades funcionales específicas hasta que, finalmente, con la aparición del proto-ribosoma y la selección natural del DNA como reservorio genético daría comienzo el mundo del DNA.



Partiendo del diseño de péptidos sencillos presuntamente prebióticos, durante este trabajo se han cumplido de forma concreta los siguientes objetivos:

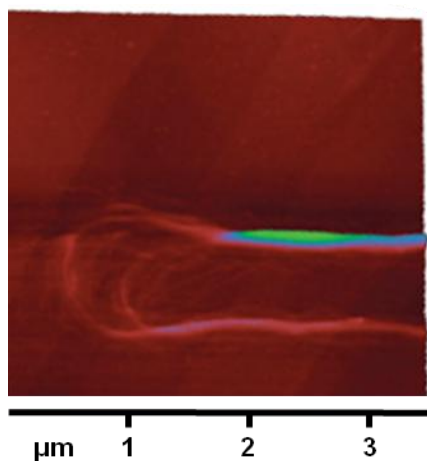
- 1- Diseñar péptidos que adoptarán conformaciones helicoidales y poseerán afinidad por los RNAs.
- 2- Realizar un estudio estructural de estos nuevos péptidos.
- 3- Probar su acción frente a RNAs de diversa estabilidad conformacional.
- 4- Estudiar los efectos de la supresión de los residuos C-terminales aromáticos en la estructura de péptidos formados por aminoácidos putativamente prebióticos.
- 5- Poner a prueba la capacidad de unión de arenos con estos péptidos prebióticos.
- 6- Diseñar péptidos sencillos que puedan adoptar una estructura en horquilla  $\beta$ .
- 7- Determinar la estructura y estabilidad de dichos péptidos.
- 8- Monitorizar la interacción entre estos péptidos y los diferentes NTPs.

### **3. ESTVDiOS PREViOS**



### 3.1. Péptidos KIA: secuencias presuntamente prebióticas ricas en Lys

En base a métodos de diseño de moléculas aminoacídicas presuntamente prebióticas (Crick 1953; Schafmeister et al. 1997; Zhang et al. 2002) se propuso una serie de péptidos formados mayoritariamente por posibles residuos generados en condiciones prebióticas. Sin ninguna intención de restar credibilidad a la idea de que el RNA fuese la primera biomolécula que apareció en la Tierra, sí podríamos considerar a estos compuestos unos candidatos válidos para haber compartido ese “RNA World” con los ácidos nucleicos. Siguiendo estas premisas, unos años atrás se llevó a cabo el estudio estructural y funcional de un conjunto de posibles péptidos prebióticos de estructura helicoidal y características anfipáticas. La estructura primaria de estos péptidos, englobados dentro de la serie de compuestos denominada “serie KIA”, sigue una secuencia consenso compuesta por 20 aminoácidos distribuidos de la siguiente manera: Ac-AK<sub>x</sub>AA<sub>xx</sub>KA<sub>x</sub>AA<sub>xx</sub>KAGGY-NH<sub>2</sub>, donde “x” puede ser Ala o Ile, de modo que se estudiaron los péptidos resultantes de todas las posibles combinaciones que se pueden obtener con 4 Ile y 2 Ala (Boon et al. 2004). Tras analizar la estructura y estabilidad de los péptidos y poner a prueba la interacción entre monómeros se observó que los monómeros de diez de ellos interaccionaban para dar lugar a estructuras helicoidales de tipo glóbulo fundido; dos parecían quedar desestructurados; dos se auto-asociaban para dar lugar a filamentos helicoidales de varias micras de longitud (Frost et al. 2005) (Figura 4) y el caso más sorprendente fue el de KIA7, que presentaba una elevada estabilidad con respecto al resto de péptidos de esta misma



**Figura 4.** Imagen obtenida mediante AFM en la que pueden observarse las fibras formadas por el péptido KIA13, a una concentración de 120  $\mu$ M en presencia de NaCl 1M. La prueba decidió llevarse a cabo tras observarse cambios en los espectros de CD y al haberse percibido cierta turbidez durante la manipulación de las muestras (Frost et al. 2005).

familia y, al contrario que ellos, presentaba una fluorescencia del ANS mucho menor en comparación con el elevado contenido de hélice  $\alpha$  detectado en su estructura (ANS es un fluoróforo de gran utilidad empleado para detectar conformaciones de glóbulo fundido ya que es secuestrado por los bolsillos hidrófobos generados). El hecho de que el ANS tuviese impedimentos para acceder a las zonas hidrófobas de KIA7, junto con la elevada proporción de estructura en hélice  $\alpha$  detectada,

sugería que el péptido era capaz de adoptar una conformación tetramérica estable y bien plegada conocida como conformación “four helix bundle”. Poseía una disposición espacial de los monómeros en forma de “X” (“four helix X-bundle”) y presentaba una cooperatividad entre las unidades similar a la observada en proteínas nativas con este tipo de dominios (Harris et al. 1994; Kamtekar and Hecht 1995; Hill and DeGrado 1998).

Mediante experimentos de centrifugación analítica, se corroboró la presencia de estructuras oligoméricas en las muestras estudiadas, apoyando la idea de las conformaciones tetraméricas deducidas a partir de los resultados obtenidos por RMN y las estructuras logradas en los cálculos de dinámica molecular. Los NOEs intermoleculares detectados mediante espectroscopia de RMN y los experimentos de MS realizados para detectar enlaces por puentes disulfuro entre péptidos CG<sub>3</sub>KIA7 (con extremos modificados añadiendo tres Gly y una Cys), permitieron conocer que las hélices de los cuatro monómeros que formaban el ovillo se encontraban orientadas de forma antiparalela dos a dos, albergando un “bolsillo” hidrófobo en el centro. Así, se hizo patente el hecho de que péptidos compuestos prácticamente por solo tres tipos de aminoácidos pueden dar lugar a conformaciones estables con cierta especificidad estructural.

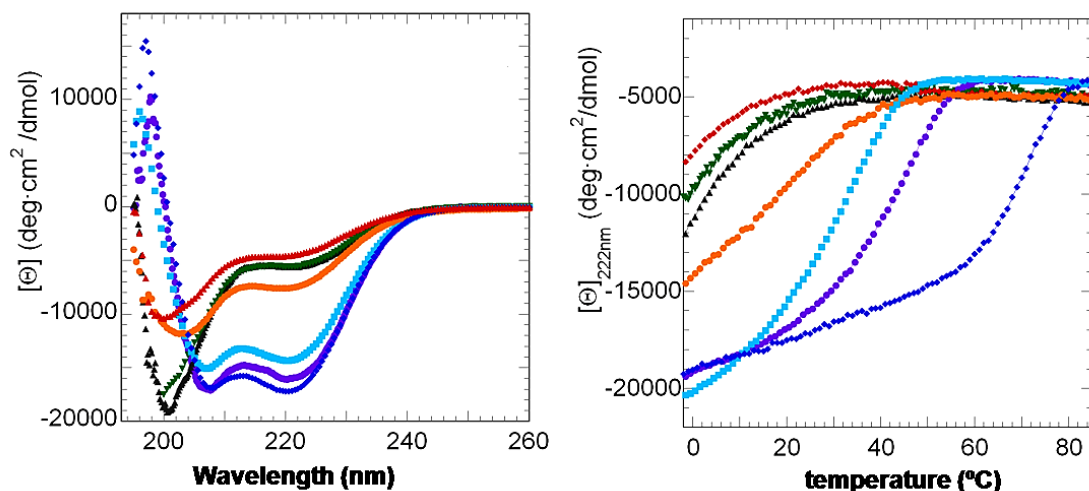
En trabajos posteriores, el objetivo fue el estudio de dichos péptidos tetraméricos helicoidales, la variabilidad de su secuencia y la contribución a la integridad estructural de cada uno de los aminoácidos propuestos durante su diseño. Como fruto de estas nuevas investigaciones surgió la familia de los péptidos KIA7.

### **3.2. Péptidos KIA7: tetrámeros helicoidales, unión y degradación de RNAs**

Centrándose en los tetrámeros helicoidales formados durante el análisis de los péptidos KIA, se propuso el diseño una nueva batería de compuestos: los péptidos KIA7, con una secuencia Ac-AKAAAAAIKAIAAIKAGG $\phi$ -NH<sub>2</sub> con los extremos modificados, en la que el extremo C-terminal se modificó empleando diferentes aminoácidos ( $\phi$ : Phe, His, Ile, Trp o Tyr), o se eliminó provocando la deleción de uno (KIA7 $\Delta$ ) o más (KIA7 $\Delta\Delta\Delta$ ) de estos residuos carboxiterminales. Mediante estudios de estabilidad conformacional se pretendía comprobar cuál era la expresión mínima de este tipo de compuestos para que péptidos sencillos pudiesen haber dado lugar a proteínas específicamente plegadas en un ambiente prebiótico. Al mismo tiempo, se intentó elucidar el papel de los residuos C-terminales en el establecimiento de estructuras estables (López de la Osa et al. 2007; López-Alonso et al. 2010). Después de analizar la estructura y estabilidad de los polipéptidos,

las investigaciones llevadas a cabo permitieron descubrir que para adoptar una conformación tetramérica única, bien definida y estable, las proteínas de esta serie requieren de una secuencia con una extensión de al menos 20 aminoácidos, en la que es preciso que el residuo C-terminal tenga una cadena lateral aromática. En el caso de estas estructuras helicoidales, péptidos de menor tamaño son demasiado sencillos y presentan estructuras total o parcialmente desplegadas, si bien se ha descubierto que secuencias menores son capaces de formar estructuras en hebra  $\beta$  y amiloides estables.

Los péptidos KIA7 ven aumentada su estabilidad a medida que incrementa el tamaño y la hidrofobicidad de los grupos aromáticos ( $\text{His}^+ < \text{His}^0 < \text{Tyr} < \text{Phe} < \text{Trp}$ ) (López-Alonso et al. 2010) (Figura 5). Los aminoácidos aromáticos, con ayuda del giro formado por las Gly, son capaces de orientarse hacia el bolsillo hidrófobo estableciendo interacciones de van der Waals con los residuos adyacentes (Figura 6). Por otro lado, la variante KIA7I de estos péptidos, con un residuo



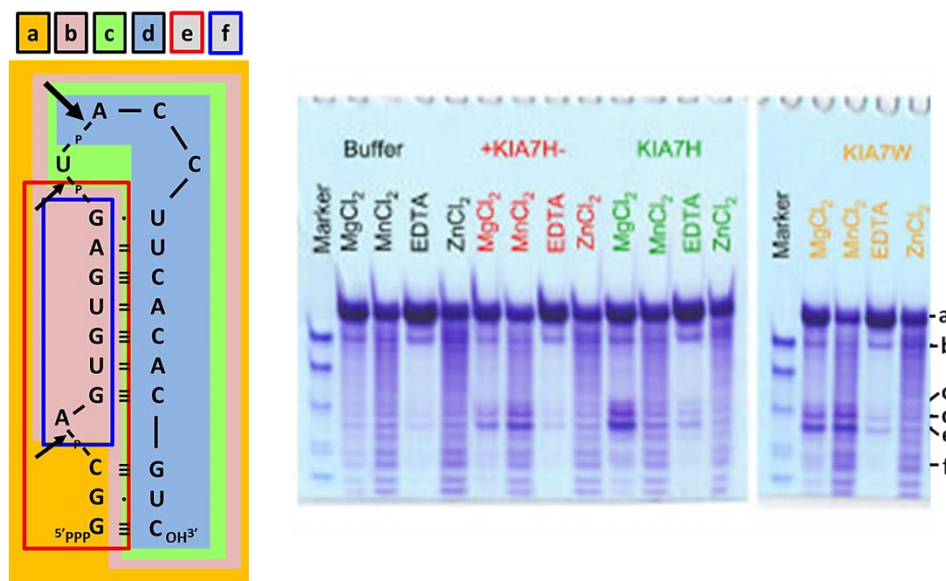
**Figura 5.** Espectros de CD, en el rango de luz UV cercano, donde pueden observarse de forma representativa tanto la estructura como la curva de desnaturalización de algunas de las variantes de los péptidos KIA y KIA7. Las muestras se encuentran a una concentración de 120  $\mu\text{M}$  en presencia de NaCl 0,2 M y en disolución 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$  tamponada a pH 5.0 con H/NaAc 10 mM. KIA5 (rojo) y KIA10 (naranja) parcialmente desestructurados y con temperaturas de fusión menores de 20 °C; KIA7 $\Delta$  (negro) y KIA7I (verde) con mínimos a  $\lambda = 200$  nm característicos de estructuras de ovillo estadístico y temperaturas de fusión muy bajas; KIA7F (violeta), KIA7Y (azul claro) y CG<sub>3</sub>KIA7 (azul oscuro), con curvas típicas de conformaciones en hélice  $\alpha$  y temperaturas de fusión de hasta 70 °C (López de la Osa et al. 2007).

carboxiterminal de Ile, quedaba totalmente desplegada en agua y sólo daba lugar a los tetrámeros helicoidales en presencia de altas concentraciones de sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 M). Aun con todo, dichos péptidos peor plegados poseían una estabilidad moderada frente al intercambio H/D, un desplegamiento térmico cooperativo y un núcleo hidrófobo estrechamente empaquetado. Por ello, desentrañar cuánto afecta la ausencia de grupos aromáticos a la estructura de este tipo de compuestos fue una de las prioridades en los ensayos posteriores, los cuales se detallan más adelante en el capítulo 5.



**Figura 6.** Superposición de diez estructuras calculadas para diferentes variantes de KIA7: KIA7Y, en rojo (PDB: 2jo4); KIA7F, en azul (PDB: 2jo5); KIA7H, en verde; y KIA7W, en naranja. Cabe destacar el empaquetamiento del grupo aromático C-terminal (con Tyr, Phe, His y Trp, respectivamente) hacia el bolsillo hidrófobo (López-Alonso et al. 2010).

También se puso a prueba la capacidad de interacción y la funcionalidad de los péptidos más estructurados de la serie frente a RNAs de distinta naturaleza: RNA  $\tau$ 10 (relacionado con enfermedades como Alzheimer y Parkinson, ya que controla la proporción de isoformas de proteína tau encargadas de estabilizar los microtúbulos en las neuronas del sistema nervioso central) de estructura en “stem-loop” (también denominado estructura de tallo-lazo o en horquilla) (D'Souza and Schellenberg 2005; Rosenmann et al. 2012), un ssRNA sin estructura definida y el tRNA<sup>Tyr</sup><sub>1</sub> de *E. coli*. Como resultado se encontró que péptidos sencillos de 20 residuos, compuestos en su mayoría por aminoácidos putativamente prebióticos, son capaces de interactuar con RNAs y catalizar la digestión de ácidos ribonucleicos con estructura definida de forma selectiva, en presencia de ciertos cationes divalentes (predominantemente  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) (Figura 7). La interacción con los péptidos KIA7 aumenta la velocidad de degradación de los RNAs en un factor de  $10^3$ - $10^4$ , un valor similar al observado en construcciones artificiales que se han creado hasta la fecha intentando imitar el rendimiento logrado por las ribonucleasas naturales (Mironova et al. 2007; Kovalev et al. 2008). La hipótesis principal se basa en que estos péptidos provocan cambios conformacionales en las estructuras bien definidas de los RNAs, a los que permanecen unidos mediante interacciones coulombianas o fuerzas de van der Waals. Es entonces cuando tiene lugar el ataque electrofílico por parte de los aminoácidos básicos sobre el sustituyente 2'-OH de los grupos fosfato que quedan menos protegidos.



**Figura 7.** Resultados de un ensayo en gel desnaturizante urea-PAGE al 20% tras 56 horas de reacción entre diferentes péptidos KIA7 y RNA  $\tau$ 10 (izquierda) en presencia de cationes divalentes y EDTA, a pH 7.2 y 30 °C, con unas concentraciones finales de péptido y RNA de 0,15-0,60 y 0,4 respectivamente. El marcador de tamaño mostrado está formado por una mezcla de ssDNA con 24, 20, 16, 12 y 8 nucleótidos. Se pueden observar los productos de la actividad ribonucleolítica de +KIA7H- (una variante de KIA7H sin los grupos N-acetil y C-amida terminales), KIA7H y KIA7W. La identidad de las bandas más nítidas fue determinada mediante MS: a) RNA intacto 5'pppG1-C253', b) A4-C25, c) U12-C25, d) A13-C25, e) pppG1-U12>p y f) A4-U12>p (López-Alonso et al. 2010). Los sitios de corte predominantes en el RNA  $\tau$ 10 se encuentran indicados por las flechas en la imagen de la izquierda (Varani et al. 1999).

### 3.3. Química prebiótica y síntesis peptídica: Arg frente a Lys

Conocidas algunas de las propiedades que debían de poseer estos péptidos a la hora de dar lugar a estructuras estables y bien plegadas capaces de interaccionar con RNAs, la idea que surgió a continuación fue la de obtener péptidos similares, formados exclusivamente por aminoácidos plausiblemente prebióticos y que tuviesen mejores capacidades de unión a ácidos nucleicos. Este sería uno de los requisitos indispensables para poder defender la cohabitación entre péptidos y RNAs en un posible ambiente primigenio, por lo que dirigimos nuestro interés hacia los dominios ricos en Arg (ARMs), presentes fundamentalmente en proteínas que se unen a RNA y que en la mayoría de los casos resultan ser dominios esenciales para la funcionalidad de las macromoléculas de las que forman parte (Lazinski et al. 1989; Frankel and Smith 1998; Perez-Canadillas and Varani 2001). En base a esto, se propuso sustituir las Lys de los péptidos KIA7 por Arg, surgiendo de esta forma los péptidos RIA7.

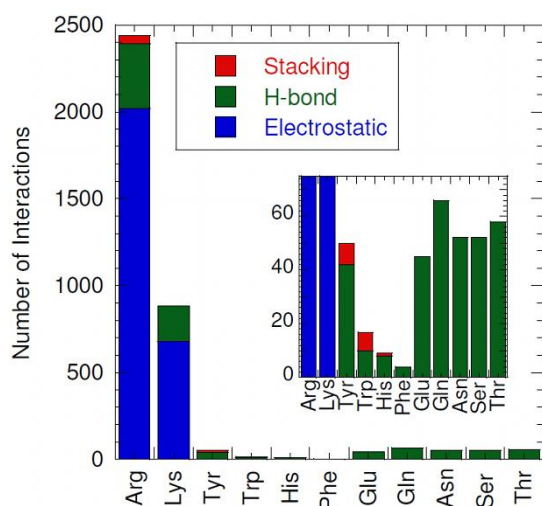




4. RiA7



Aunque, al igual que Lys, la Arg podría no parecer el candidato perfecto como aminoácido putativamente prebiótico (Amend and Shock 1998; Trifonov 2000; Higgs and Pudritz 2009), como se ha mencionado, su presencia es muy frecuente en péptidos y proteínas que se unen a RNAs (Weiss and Narayana 1998). Por ello, en este proyecto, nos propusimos incluir Arg en las secuencias de KIA7 y así intentar mejorar su estabilidad y capacidad de interacción con los RNAs dentro de un hipotético “RNA-peptide world”. Al igual que sus predecesores, los péptidos RIA7 están compuestos solo por Ala, Gly, Ile y un residuo aromático C-terminal (Tyr en el caso de RIA7Y, el péptido sujeto a los experimentos realizados de forma representativa), además de Arg ocupando el lugar de las Lys. Hemos estudiado la estructura y la estabilidad conformacional de los péptidos RIA7, así como su actividad frente a RNAs de diversa naturaleza, mediante experimentos de DC, monitorización de la desnaturalización, ensayos de intercambio de hidrógeno, espectroscopia de RMN y espectrometría de fluorescencia, entre otras técnicas. Escogimos RIA7Y (estructura primaria: Ac-ARAAAAAIRAIAAIRAGGY-NH<sub>2</sub>) como péptido de referencia para el resto de compuestos de la misma familia, al suponer un comportamiento similar al de sus homólogos con Lys, entre los que KIA7Y poseía unas capacidades de plegamiento e interacción con RNAs intermedias dentro del conjunto de moléculas (Diez-García et al. 2012). Además de por la capacidad de unión a RNA que caracteriza a los motivos ricos en Arg, pensamos también que el cambio otorgaría a los péptidos unas mayores capacidades de reconocimiento e interacción con los ácidos nucleicos, gracias a la flexibilidad de la cadena lateral de la Arg y a las propiedades del grupo guanidino. Esta clase de sustituyentes podría dar lugar a un mayor número de puentes de hidrógeno, tanto con las bases (especialmente si existen apareamientos G·U) como con los grupos fosfato del ácido nucleico (Cheng et al. 2003; Woods and Ferre 2005), pudiéndose también formar interacciones del tipo catión- $\pi$  con las bases nitrogenadas (Dougherty 1996) o incluso llegar a ocurrir fenómenos de apilamiento con el RNA (Figura 8).



**Figura 8.** Gráfico en el que se resumen los datos extraídos de una base de datos de interacciones proteína-RNA en la que se recogen las estructuras en alta resolución de hasta 42 complejos RNA-proteína no redundantes depositados en el PDB (<http://www.bioc.rice.edu/~shamoo/prid.html>). El estudio muestra los aminoácidos que interaccionan preferentemente con RNA a través de puentes de hidrógeno (verde), interacciones electrostáticas (azul) o fenómenos de apilamiento (rojo). En el gráfico de menor tamaño se recogen los valores obtenidos para los residuos que presentan interacciones más débiles. Observando el diagrama de barras se puede ver perfectamente que la Arg sería el candidato perfecto para formar parte de un péptido que interactuase con RNA (Morozova et al. 2006).

En principio, el intercambio de Arg por Lys en la secuencia de péptidos KIA7 no debería afectar demasiado a la estructura de los compuestos, sobre todo si tenemos en cuenta que las cadenas laterales de estos aminoácidos básicos se situarían orientadas hacia el exterior de las hélices. Además, tal y como demuestran algunos estudios, la Arg por sí misma otorgaría una estabilidad superior a la ofrecida por los residuos de Lys, especialmente en lo concerniente a su sensibilidad térmica (Menendez-Arias and Argos 1989; Mrabet et al. 1992; Betts and Russell 2003). Según las estructuras de proteínas almacenadas en las bases de datos actuales se ha podido también descubrir que a menor longitud en la estructura de los péptidos helicoidales mayor es la frecuencia con la que Lys y, en mayor medida Arg, aparecen en las secuencias de los mismos (Wang and Feng 2003). La capacidad para formar puentes de hidrógeno y su carácter anfipático son dos de las propiedades clave que habrían hecho a la Arg predominante sobre otros aminoácidos en estructuras de proteínas capaces de formarse en condiciones extremas. Esta mayor frecuencia de aparición en los organismos más primitivos explicaría también que dicho residuo esté tan degenerado desde el punto de vista del código genético actual, pudiendo ser codificado por hasta seis codones diferentes (White 1992). Otros autores tratan de dar explicación a su aparición a partir de la evolución química de la Lys u Orn (McDonald and Storrie-Lombardi 2010). En cualquier caso, todas estas hipótesis se centran en desentrañar las primeras etapas que dieron origen a su aparición, ya que no parece haber ninguna duda sobre la necesidad de contar con la Arg en las secuencias peptídicas de un posible “RNA-peptide World” (Kashiwagi et al. 2009; Perez-Cano and Fernandez-Recio 2010).

#### **4.1. Caracterización estructural: conformación “four helix bundle”**

Conocidas las estructuras representativas de la familia de péptidos KIA7, nos propusimos elucidar la conformación adoptada por RIA7, un péptido de secuencia análoga con Arg en lugar de Lys. Teniendo en cuenta que el intercambio de un aminoácido básico por otro no debería alterar las estructuras, era de esperar una conformación tetramérica helicoidal en forma de ovillo, quizás con cierta alteración en la ordenación espacial debido al carácter desnaturalizante del grupo guanidino y la deslocalización de las cargas en los extremos de las cadenas laterales de las Arg. El estudio estructural se llevó a cabo mediante ensayos por espectroscopia de RMN, CD y ensayos de dinámica molecular.

#### 4.1.1. CD: estructuras helicoidales de estabilidad similar a la de péptidos con Lys

El péptido RIA7 fue analizado inicialmente mediante dicroísmo circular, empleando el material y los métodos descritos en la sección 8.3 de este mismo trabajo. En el caso concreto de los experimentos de CD de RIA7, la concentración de las muestras fue de 120 - 600  $\mu\text{M}$  (635  $\mu\text{M}$  para los experimentos de estabilidad térmica) con NaCl 0,2 - 1 M en 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ , todo ello tamponado a pH 5.0 con H/NaAc 10 mM (condiciones idóneas para realizar también las medidas de RMN) y fueron escaneadas a razón de 20 nm/min, recogándose 4 acumulaciones por espectro, de forma que los valores de CD aparecen en nuestros resultados como elipticidad molar ( $[\Theta]$ ). También se llevaron a cabo experimentos de desnaturalización térmica, monitorizando la señal a 222 nm a diferentes intervalos de temperaturas, desde -2 o -5  $^{\circ}\text{C}$  hasta 85  $^{\circ}\text{C}$  en intervalos de 0,5  $^{\circ}\text{C}$  (aumentándose la temperatura unos 40  $^{\circ}\text{C}$  cada hora). Todas las muestras recuperaron su elipticidad inicial al enfriarse hasta la temperatura de partida y el valor de temperatura correspondiente al valor intermedio entre la elipticidad máxima y mínima fue tomado como valor medio de desnaturalización térmica, excepto para los casos en los que la desestructuración de la molécula era patente. La estabilidad térmica del péptido y la constante del equilibrio de desnaturalización (K) se calcularon suponiendo un modelo extendido de dos estados para RIA7 en el que desplegamiento y disociación se encuentran vinculados. Se considera el siguiente equilibrio de plegamiento/desplegamiento entre conformaciones tetraméricas plegadas y unidades monoméricas desnaturalizadas:



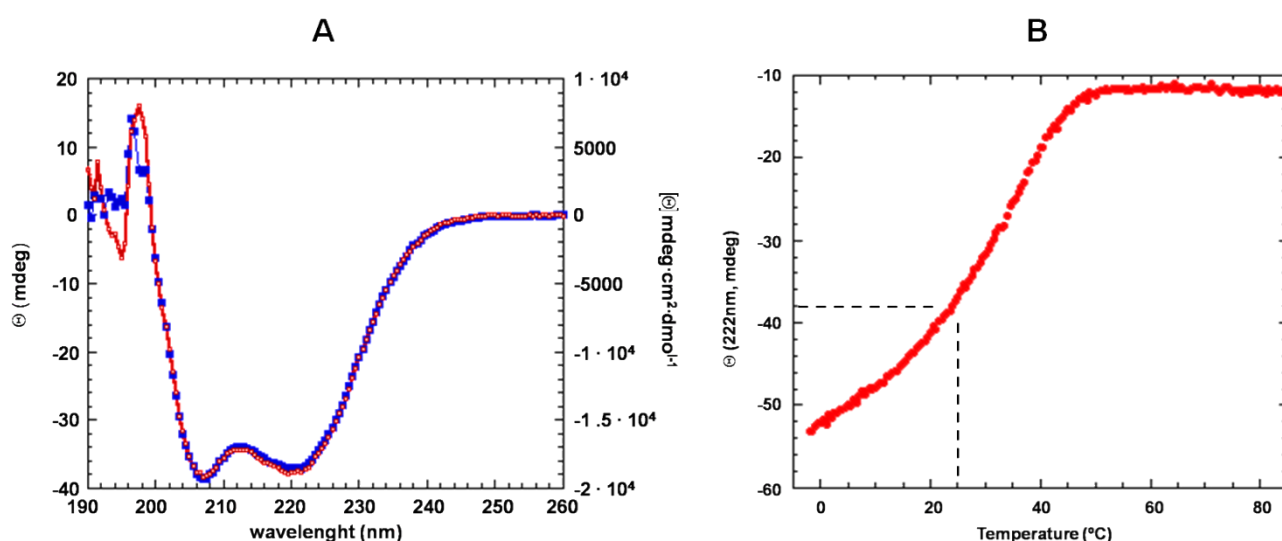
$$K = \frac{[\text{D}]^4}{\text{N}} = \frac{256 \cdot \text{C}_t^3 \cdot \text{F}_D^4}{1 - \text{F}_D} \quad (2)$$

Donde  $\text{C}_t$  es la concentración de RIA7 en términos de tetrámeros y  $\text{F}_D$  es la fracción de péptido que se encuentra desnaturalizado, cuyos valores se conocieron, en presencia de urea, teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{F}_D = \frac{y-n}{d-n} \quad (3)$$

Donde “y”, “n” y “d” son los valores de elipticidad obtenidos, experimentalmente, en estado nativo y en estado desnaturalizado respectivamente, a una temperatura dada (Backmann et al. 1998).

Después, de acuerdo con las ecuaciones de Van't Hoff y Gibbs, se determinaron la entalpía y la entropía mediante la regresión lineal entre  $\ln K$  y  $1/T$ , donde  $T$  es la temperatura absoluta. Las curvas resultantes de estos experimentos de CD fueron similares a las obtenidas con las variantes más estables de KIA7 analizadas en las anteriores publicaciones. Los espectros de CD, adquiridos a 25 °C (Figura 9A), mostraban unos claros valores mínimos a 221 y 208 nm y un máximo a longitudes de onda inferiores a 200 nm, lo que indica que RIA7 adopta claramente una estructura de hélice  $\alpha$ . Como se ve reflejado en el experimento de desnaturalización térmica (Figura 9B), el péptido es bastante estable ( $T_m \approx 50$  °C) y se puede observar que los valores máximo y mínimo característicos de la estructura helicoidal apenas varían después de alcanzarse la temperatura de fusión, de lo que se deduce que la desnaturalización es reversible.



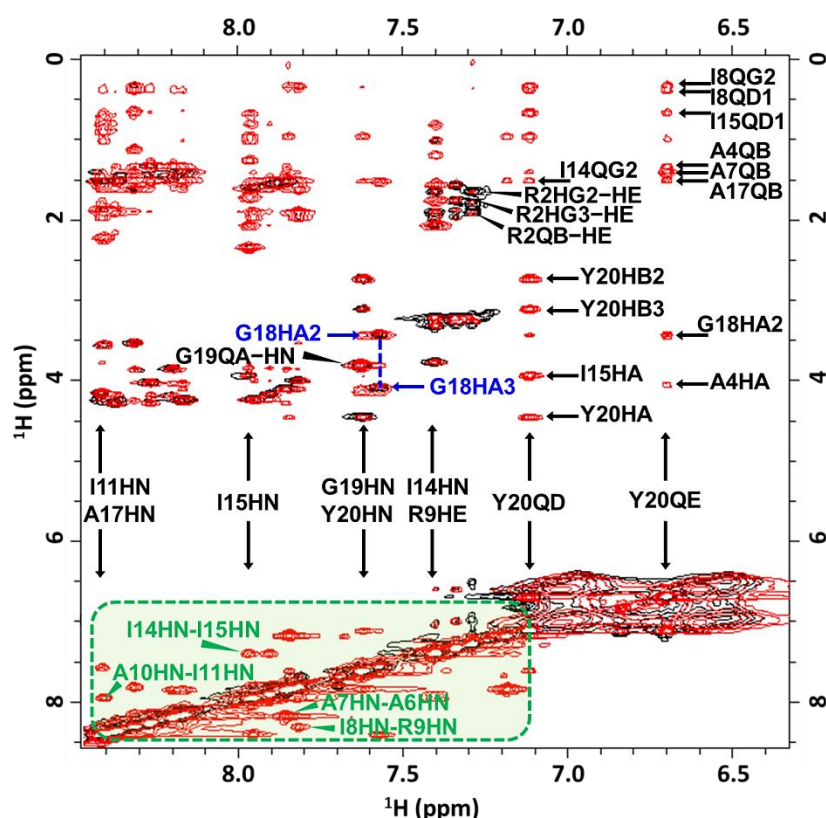
**Figura 9. A)** Experimento de CD de muestras de RIA7, antes (azul) y después (rojo) de alcanzar la temperatura de fusión en una disolución con NaCl 0,2 M en presencia de H/NaAc 10 mM a pH 5.0 y 25 °C. **B)** Ensayo de estabilidad térmica para RIA7 en disolución NaCl 0,2 M, en presencia de H/NaAc 10 mM a pH 5.0.

En base a experimentos adicionales de desnaturalización térmica, llevados a cabo con distintas concentraciones tanto de RIA7 como de KIA7, variando además la proporción de NaCl presente en las muestras, pudimos concluir que la estabilidad térmica de una y otra clase de péptidos es equivalente, una vez que se tienen en cuenta las condiciones experimentales en cada caso (Apéndice 1).

#### 4.1.2. RMN: orientación antiparalela de las hélices en la conformación tetramérica

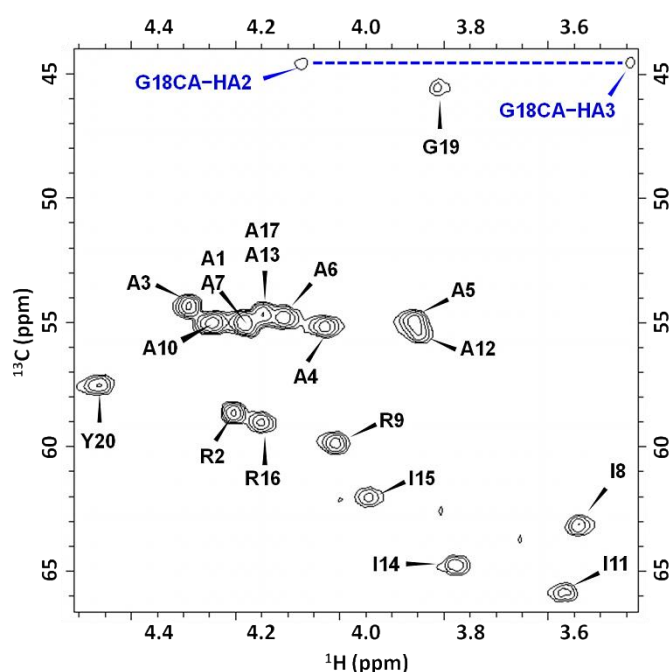
Los espectros de RMN fueron obtenidos mediante los equipos y fundamentos descritos en el apartado de materiales y métodos 8.5. Los experimentos 1D  $^1\text{H}$ , 2D TOCSY ( $\tau_m = 60, 80$  y  $100$  ms), 2D NOESY ( $\tau_m = 60, 80$  y  $100$  ms) y 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, nos permitieron conocer las posibles interacciones intra e intermoleculares que tienen lugar en el caso de RIA7; pudimos obtener información acerca de la estructura predominantemente helicoidal de los péptidos y, tras deducir la presencia de estructuras tetraméricas, fuimos capaces de calcular un modelo molecular basado en las asignaciones de las resonancias correspondientes a cada uno de los NOEs detectados. Haciendo uso de estos mismos métodos, logramos también realizar experimentos de intercambio protón/deuterio, para así detectar la formación de puentes de hidrógeno. Una vez adquiridos y procesados los espectros de RMN mediante el software TopSpin, pudimos asignarlos totalmente empleando las premisas convencionales del campo de la RMN (Wüthrich 1986; Markley et al. 1998). Como resultado, comprobamos la existencia de NOEs típicos de estructuras en hélice  $\alpha$  estables e interacciones intermoleculares entre protones correspondientes a residuos de monómeros diferentes, al igual que ocurría en el caso de los péptidos KIA7 (Apéndice 2). Se detectaron de forma independiente las señales correspondientes a los protones  $\alpha$  de la Gly 18, con una separación de casi 1 ppm, un indicio característico de la formación de un giro estructuralmente estable, algo también descrito para los péptidos con Lys. Los numerosos NOEs observados pertenecían a las interacciones propias de residuos adyacentes en una estructura con conformación en hélice  $\alpha$  ( $^1\text{HN}$ - $^1\text{HN}_{(i,i+1)}$ ,  $^1\text{HN}$ - $^1\text{H}\beta_{(i,i+1)}$  o  $^1\text{HN}$ - $^1\text{H}\alpha_{(i,i+1,3,4)}$ ). Múltiples señales, coincidentes con los desplazamientos químicos de átomos del residuo de Tyr 20, indicaban la importancia del aminoácido carboxiterminal a la hora de dar lugar a una estructura específicamente plegada, de modo que el residuo aromático parecía encontrarse orientado hacia el bolsillo hidrófobo del núcleo de la molécula (Willis et al. 2000). Además, los NOEs entre residuos N y C-terminales y los NOEs de largo alcance observados entre residuos bastante distanciados, sirvieron como indicativos claros de una orientación antiparalela de los monómeros de RIA7 dentro de la estructura tetramérica (Figura 10).



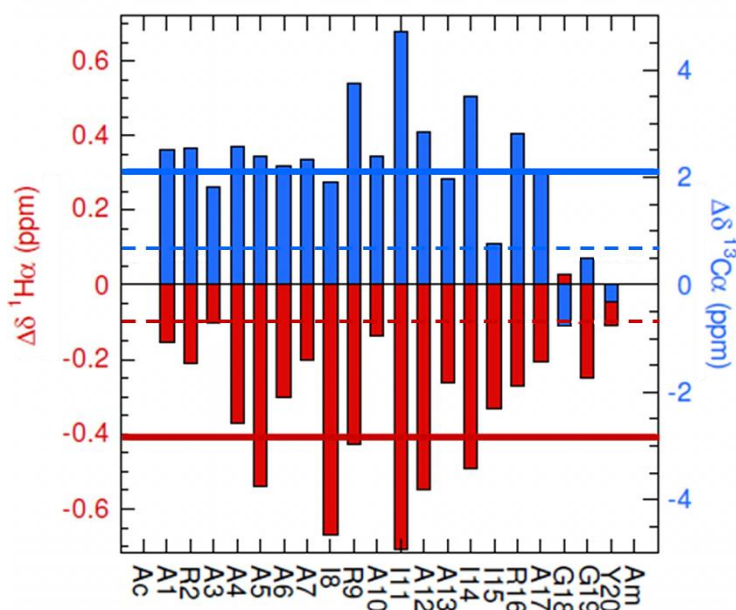


**Figura 10.** Espectros 2D TOCSY (negro) y NOESY (rojo) de RIA7 adquiridos en presencia de NaCl 200 mM, tampón H/NaAc 10 mM, 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O y DSS 50  $\mu$ M a 5  $^{\circ}$ C y pH 4.5, con un  $\tau_m$  = 60 ms. La concentración del péptido se encontraba entre 1,0 y 2,5 mM. Las muestras se colocaron en tubos de resonancia de 3mm de diámetro para reducir el apantallamiento de los pulsos debido a los efectos de la fuerza iónica al añadir las sales. Los ejemplos asignados para algunos de los residuos se muestran siguiendo el código de una letra. En azul, se señala el distanciamiento característico de los  $^1\text{H}\alpha$  de Gly 18 y, en la región verde, se pueden observar los NOEs entre átomos  $^1\text{HN}$  de residuos adyacentes (Diez-García et al. 2012).

Los experimentos 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 11) fueron de gran ayuda a la hora de asignar las señales solapadas de átomos de distintos residuos y también fueron empleados para analizar las diferencias entre los desplazamientos químicos de RIA7 y los correspondientes a los aminoácidos equivalentes en un ovillo estadístico (Wishart et al. 1991), con el fin de comprobar qué aminoácidos formaban parte de las estructuras helicoidales (Figura 12).



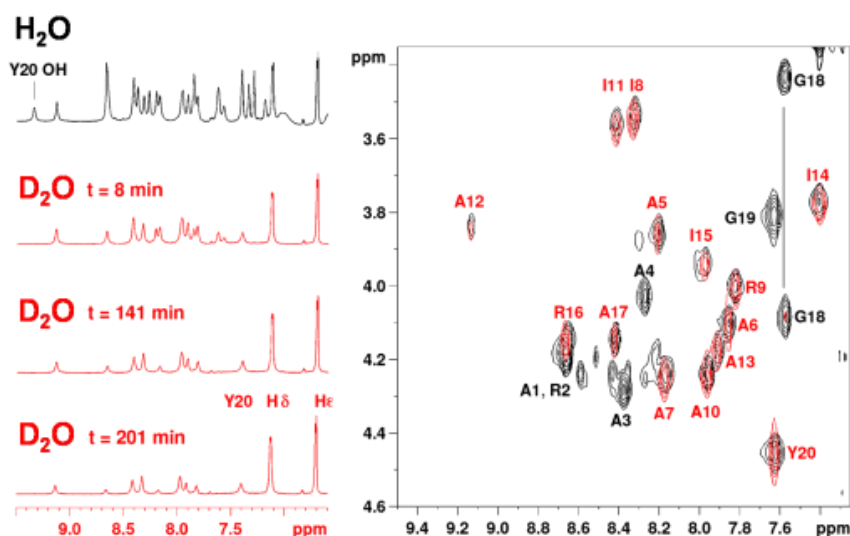
**Figura 11.** Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de RIA7 en D<sub>2</sub>O al 100%, tampón H/NaAc 10 mM y NaCl 200 mM a pH 5 y 5  $^{\circ}$ C. Las señales entre los átomos  $^1\text{H}\alpha$  y  $^{13}\text{C}\alpha$  para cada uno de los residuos se muestran usando el código de aminoácidos de una sola letra. Los espectros fueron asignados totalmente para luego emplear los resultados en los análisis de desplazamientos químicos. Además, se puede observar la diferencia entre los  $^1\text{H}\alpha$  de Gly 18 (en azul), una evidencia característica de que el péptido se encuentra estructurado de manera específica y forma un giro en esa posición, tal y como ocurría en el caso de los péptidos KIA7.



**Figura 12.** Análisis conformacional de  $\delta$  en el que se comparan las diferencias entre los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}\alpha$  (barras rojas y eje vertical izquierdo) y  $^{13}\text{C}\alpha$  (barras azules y eje vertical derecho) entre nuestro péptido y una conformación de ovillo estadístico equivalente para cada aminoácido, teniendo en cuenta también los efectos de los residuos adyacentes (Schwarzinger et al. 2001). Las líneas discontinuas horizontales indican los valores para los cuales se puede considerar probable la posibilidad de estructuras en hélice  $\alpha$ . Las líneas continuas, los valores para los que se puede afirmar con total seguridad que estamos ante estructuras de ese tipo (Diez-García et al. 2012).

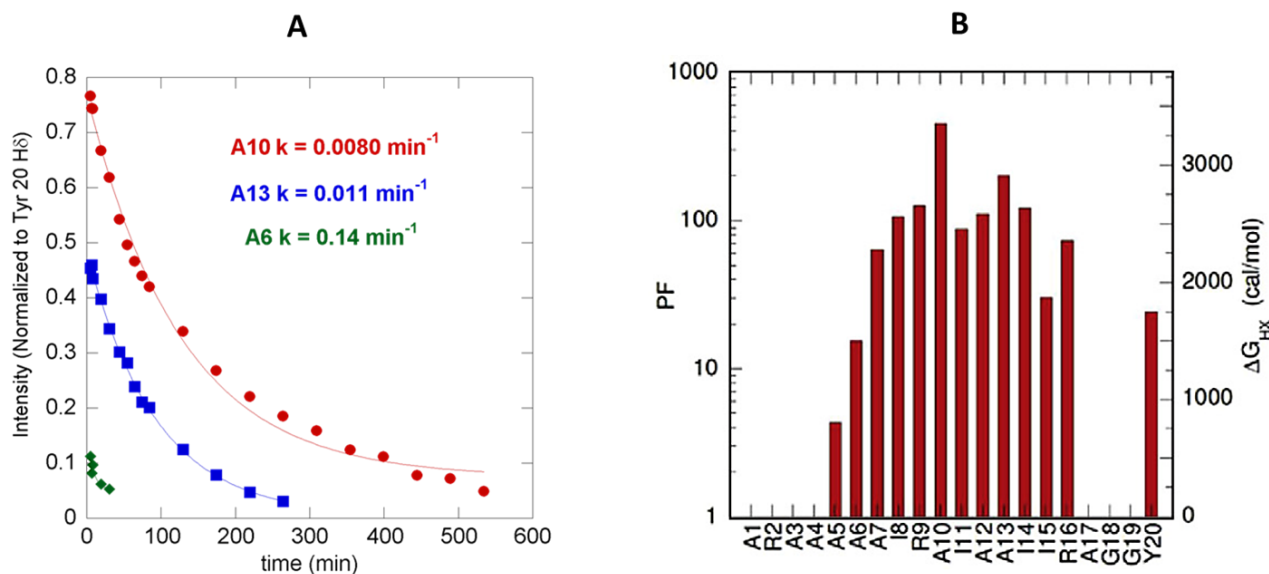
#### 4.1.3. Intercambio H/D y los residuos terminales más expuestos al medio

Monitorizando el efecto del agua pesada presente en el medio sobre los protones menos protegidos de los residuos del péptido RIA7, a través de la adquisición de espectros 1D  $^1\text{H}$  y 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, pudimos comprobar qué grupos NH se encontraban más expuestos al solvente (Ala 1, Arg 2, Ala 3, Ala 4, Gly 18 and Gly 19) y cuáles formaban puentes de hidrógeno dentro de la disposición en hélice  $\alpha$  (el resto) (Figura 13). Al comparar los espectros de las muestras con 10% y 100% de  $\text{D}_2\text{O}$ , era evidente la pérdida de señales correspondientes a los protones amídicos que presentaban una mayor libertad al encontrarse fuera de las estructuras helicoidales, al experimentar un intercambio mucho más rápido con los átomos de deuterio presentes en la disolución. Los experimentos TOCSY fueron de gran utilidad a la hora de confirmar la identidad de los residuos cuyos protones sufrían un intercambio más lento. Tanto el factor de protección (PF) como la estabilidad conformacional ( $\Delta G_{\text{HX}}$ ) fueron calculados para cada uno de los  $^1\text{HN}$ , a partir de las tasas de intercambio observadas y las tasas de intercambio intrínsecas para grupos amídicos de pequeños péptidos desestructurados, siguiendo los parámetros indicados en los trabajos de Englander (Connelly et al. 1993).



**Figura 13.** Espectros de RMN 1D (izquierda) y TOCSY (derecha) de una disolución de RIA7 2,3 mM, NaCl 0,2 M y tampón H/NaAc 10 mM a pH 5 y 5° C, con 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O (negro) y 100% de D<sub>2</sub>O (rojo). Se puede apreciar cuáles son los residuos protegidos del intercambio H/D tras añadir D<sub>2</sub>O al medio. Las señales correspondientes a los <sup>1</sup>Hε de los anillos de Tyr 20 fueron empleadas a la hora de normalizar el área de los picos que presentaban intercambio (Diez-García et al. 2012).

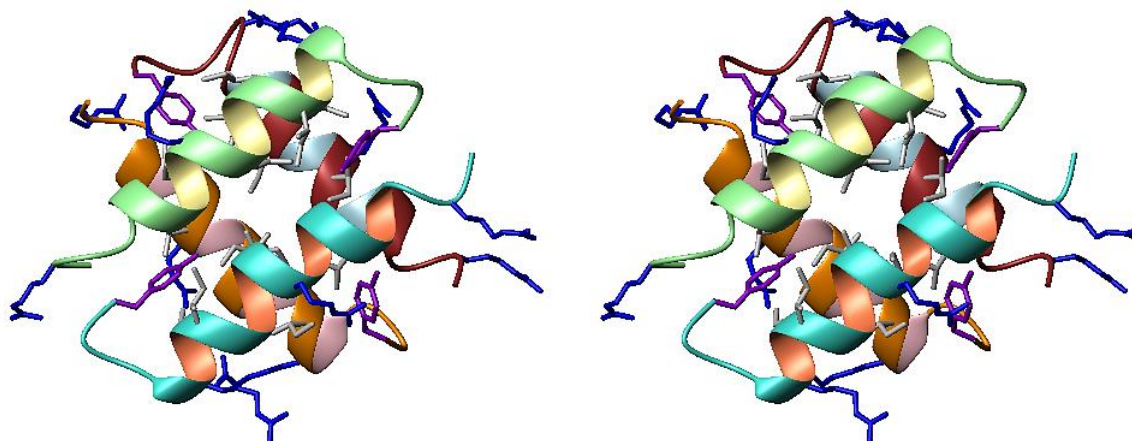
La energía libre correspondiente a la estabilidad del péptido se calculó empleando la ecuación de Gibbs:  $\Delta G = -RT \ln 1/P$ , donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y P el factor de protección ( $P = k_{rc}/k_{ex}$ ), el cual es el inverso de la constante de equilibrio entre los estados abierto y cerrado ( $K_{op}$ ) (Hvidt and Nielsen 1966). Esta ecuación supone de forma implícita que el intercambio de los átomos de hidrógeno se produce según el mecanismo EXII, más propio de moléculas estables a pHs intermedios o bajos, por el que la constante de desplegamiento es mucho mayor que la constante de intercambio intrínseco (Bruix et al. 2008) (Apéndice 3). Con el fin de asegurarnos de que, efectivamente, el intercambio en el caso de los protones amídicos de RIA7 seguía un mecanismo de este tipo, se llevaron a cabo una serie de experimentos de RMN a diferentes condiciones de pH, integrando los picos de los distintos <sup>1</sup>HN empleando alguna de las señales de la cadena lateral de la Tyr 20 para normalizar los valores, ya que dichos átomos no se ven afectados por el intercambio (Figura 14). Para calcular las constantes de intercambio intrínsecas para cada residuo, según la secuencia peptídica y las condiciones de temperatura y pH, se empleó el programa SPHERE (<http://www.fccc.edu/research/labs/roder/sphere/>) (Bai et al. 1993; Connelly et al. 1993).



**Figura 14. A)** Intensidad detectada de los picos correspondientes a alguno de los átomos de hidrógeno más estables que componen los péptidos RIA7, los cuales presentan un intercambio más lento al encontrarse formando parte de las estructuras helicoidales del péptido. La constante de intercambio calculada en cada caso durante los experimentos de intercambio H/D, viene indicada junto a las curvas resultantes. **B)** Diagrama indicando el factor de protección (eje vertical izquierdo) y la estabilidad de los  $^1\text{HN}$  por residuo (eje vertical derecho). Los valores correspondientes a alguno de los residuos no aparecen debido a que se encuentran por debajo del rango de detección, ligeramente por encima de  $\Delta G = 500 \text{ cal/mol}$  (Diez-Garcia et al. 2012).

#### 4.1.4. Dinámica molecular para la obtención de la estructura tridimensional de RIA7

Para determinar la estructura de RIA7, recurrimos al programa CYANA 3.0, el software especialmente diseñado para el cálculo automático de estructuras a partir de datos de RMN (Güntert et al. 1997; Güntert 2003; López-Méndez and Güntert 2006), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.6.1. Partiendo de los valores de los desplazamientos químicos recogidos, las restricciones de distancia derivadas de más de 1800 NOEs y los impedimentos angulares calculados con el programa TALOS+ del paquete NMRPipe (Shen et al. 2009), pudimos calcular un modelo estructural representativo para los tetrámeros compuestos por hélices  $\alpha$  dispuestas de forma antiparalela dos a dos (Figura 15). A diferencia de los péptidos KIA7 (mejor plegados), en el caso de RIA7, las diferentes estructuras empleadas en la obtención de una conformación promedio presentan una mayor movilidad en las cadenas laterales de los residuos, especialmente en aquellos situados en los extremos N y C-terminal. Parece que existe una mayor libertad espacial y ello provoca una ligera curvatura en las hélices monoméricas. Un modelo estructural correspondiente a este péptido fue depositado en la base de datos de modelos proteicos (PMDB ID: PM0077977) (Castrignano et al. 2006).



**Figura 15.** Imagen estereoscópica de la estructura de RIA7: siguiendo una conformación “four helix X bundle”, con las cadenas laterales de Ile (gris) y Tyr (púrpura) orientadas hacia el núcleo hidrófobo y las Arg (azul) expuestas hacia el exterior. En el cálculo de la estructura se tuvieron en cuenta un total de 1856 restricciones de distancia derivadas de los NOEs asignados en los espectros de RMN adquiridos. Junto a estas líneas, en unas tablas, se resumen algunos de los datos estadísticos extraídos del cálculo de la estructura (Diez-García et al. 2012).

Restricciones de distancia	NOEs
Corto alcance, $(i-j) \geq 1$	1076
Medio alcance, $(i-j) < 5$	556
Largo alcance, $(i-j) \geq 5$	224
<b>Total</b>	<b>1856</b>

RMSD	(Å)
Esqueleto peptídico (N, C $\alpha$ , C')	1,88
Todos los átomos pesados	2,57

#### 4.2. Interacción con RNAs y formación de agregados

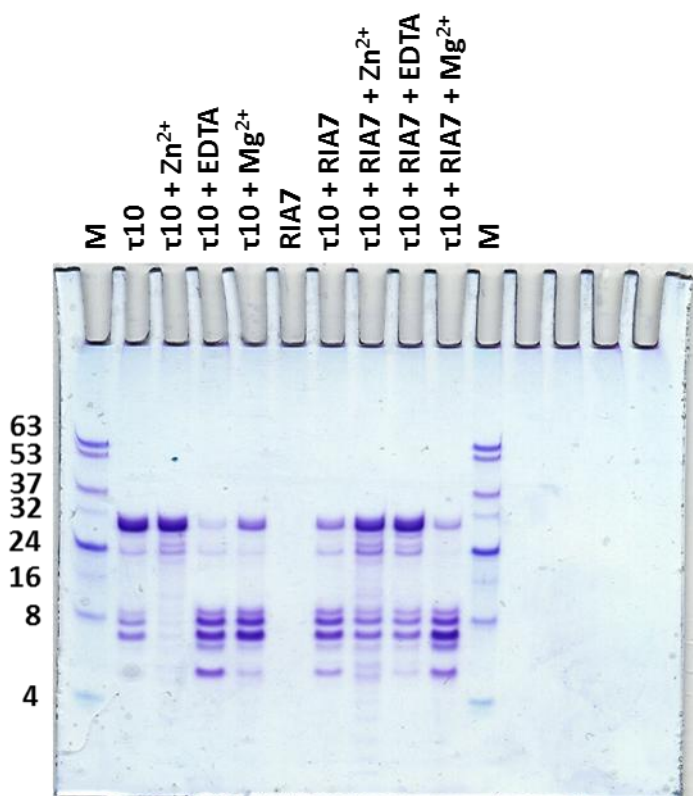
Una vez conocida la estructura de RIA7, la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos expuestos al medio, y la forma y disposición de los residuos que conforman el núcleo de la proteína ocupado por un bolsillo hidrófobo, la siguiente fase del proyecto fue analizar la capacidad de interacción de estos péptidos frente a RNAs de diversa naturaleza: RNA  $\tau$ 10, con una estructura estable en horquilla (Varani et al. 1999) y (AUUCU)<sub>9</sub>, un RNA con una estructura menos usual, relacionado con enfermedades como la ataxia espinocerebelar tipo 10, una enfermedad autosómica dominante causada por la expansión de estas repeticiones en el intrón 9 del gen SCA10 (Handa et al. 2005). Para ello, se realizaron unos experimentos iniciales con PAGE cuyos resultados, como veremos a continuación, hicieron necesario el empleo de nuevas técnicas para el análisis electroforético de la interacción entre el péptido y los ácidos nucleicos. La síntesis de los RNAs empleados se desarrolló mediante transcripción *in vitro*, tal y como se resume en la sección 8.1.2, usando la RNA polimerasa del fago T7, obtenida según el procedimiento ideado por Studier (Davanloo et al. 1984).

#### 4.2.1. PAGE vertical y horizontal en presencia de cationes divalentes y EDTA

Con el fin de determinar la capacidad de unión a RNAs y el efecto ejercido por RIA7 sobre los mismos, se llevaron a cabo ensayos de actividad del péptido frente a diferentes ácidos ribonucleicos en presencia de cationes divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ) o EDTA. Las alícuotas de estos microensayos fueron analizadas mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20% con urea, cuyo protocolo de preparación se encuentra resumido más adelante en el apartado 8.2.1. Al mismo tiempo que se pusieron a prueba las propiedades de RIA7, también se comprobó la actividad de KIA7I (estructura poco definida) y +KIA7H- (parcialmente plegado) frente al RNA  $\tau 10$ . Se usaron las pruebas con este último péptido como control positivo de la catálisis de la degradación de los RNAs durante los experimentos, ya que se había comprobado que no necesitaba encontrarse específicamente plegado para presentar actividad frente a los ácidos ribonucleicos (López-Alonso et al. 2010). La capacidad de unión a RNAs de KIA7I fue puesta a prueba por primera vez en este trabajo; las muestras cargadas en los pocillos de los geles no presentaban un patrón de bandas diferente del observado para el RNA por separado, ni siquiera en presencia de cationes divalentes o EDTA, lo que no daba indicios para pensar que hubiese algún tipo de interacción o de que el péptido afectase a la integridad de  $\tau 10$ , probablemente a causa del carácter poco estructurado de KIA7I. Las propiedades de dicho péptido serán definidas con más detalle en el capítulo 5.

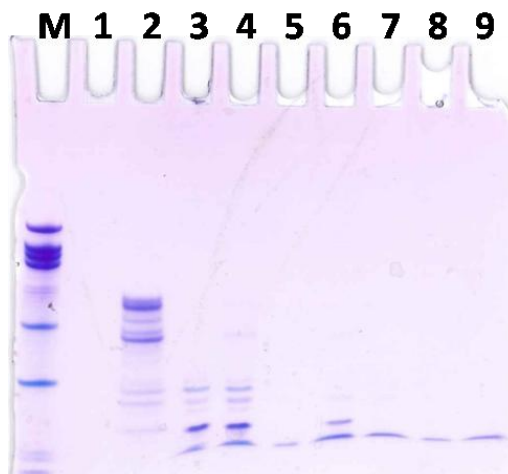
Al contrario que +KIA7H-, que sí mostraba claras evidencias de promover la catálisis de la degradación del RNA, sobre todo en presencia de  $\text{MgCl}_2$ , RIA7 mostraba un patrón de bandas inusual (Figura 16). El problema radicaba en que, en vista de estos resultados, no estábamos seguros de si RIA7 estaba catalizando la degradación del RNA o, si por el contrario, ejercía un efecto protector sobre el mismo, ya que  $\tau 10$  parecía presentar algo de degradación por sí mismo en esas condiciones experimentales. Lo que sí que se podía asegurar que estaban teniendo lugar fenómenos de interacción entre péptidos y ácidos nucleicos.





**Figura 16.** Gel desnaturalizante de urea-PAGE al 20% en el que se cargaron las muestras de uno de los experimentos realizados para comprobar la actividad de RIA7 frente a  $\tau 10$ , en tampón MOPS 50 mM pH 7 y urea 2,8 M. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 26 días. De izquierda a derecha: conjunto de marcadores de tamaño formado por ssDNAs de diferente longitud (4, 8, 16, 24, 32, 37, 53 y 63 nucleótidos);  $\tau 10$  34  $\mu$ M;  $\tau 10$  34  $\mu$ M +  $ZnCl_2$  1,1 mM;  $\tau 10$  34  $\mu$ M + EDTA·4Na·6H<sub>2</sub>O 220  $\mu$ M;  $\tau 10$  34  $\mu$ M +  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1,1 mM; RIA7 22  $\mu$ M; RIA7 22  $\mu$ M +  $\tau 10$  34  $\mu$ M; RIA7 22  $\mu$ M +  $\tau 10$  34  $\mu$ M +  $ZnCl_2$  1,1 mM; RIA7 22  $\mu$ M +  $\tau 10$  34  $\mu$ M + EDTA·4Na·6H<sub>2</sub>O 220  $\mu$ M; RIA7 22  $\mu$ M +  $\tau 10$  34  $\mu$ M +  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; y marcadores de tamaño.

Para comprobar si RIA7 se unía a RNA y actuaba como agente protector frente a la hidrólisis del ligando, se decidió llevar a cabo una serie de ensayos con mezclas de ambos compuestos en presencia de RNasa A. Tras analizar los productos de reacción mediante técnicas de urea-PAGE desnaturalizante, en un primer momento pensamos que la interacción entre el péptido rico en Arg y  $\tau 10$  mostraba ciertas propiedades catalíticas de la degradación del RNA, aunque de manera muy sutil en comparación con la actividad observada para las variantes KIA7. Esta diferencia entre las capacidades catalíticas de una y otra familia de péptidos se debería probablemente, además de a la presencia de las cadenas laterales de Arg en lugar de Lys y la distribución espacial de estos residuos cargados, a la influencia de la geometría espacial del esqueleto peptídico y la distinta rigidez de sus estructuras a la hora de interaccionar con los RNAs (Barbier and Brack 1992). Aun con todo, no se descartó la posibilidad de que la degradación observada pudiera corresponder a la proporción minoritaria de RNA que no formaba agregados con RIA7 (cargados positivamente), y quedaba totalmente expuesta a la degradación por parte de la RNasa. Es por ello que, según esta hipótesis, el péptido ejercería un papel protector, detectándose una cantidad de productos de degradación menor que en el caso de las muestras sin el péptido (Figura 17).



**Figura 17.** Gel desnaturalizante de urea-PAGE al 20% con las muestras del experimento para comprobar la actividad de RIA7 frente a  $\tau 10$  en presencia de concentraciones crecientes de RNasa A, en tampón MOPS 50 mM pH 7 y urea 2,8 M. M: conjunto de marcadores de tamaño formado por distintos ssDNAs (4, 8, 16, 22, 32, 40, 48 y 55 nucleótidos); 1: RIA7 500  $\mu$ M; 2:  $\tau 10$  40  $\mu$ M; 3: RIA7 1 mM +  $\tau 10$  40  $\mu$ M; 4:  $\tau 10$  40  $\mu$ M + RNasa A 3,2 nM; 5: mezcla 4 + RIA7 1 mM; 6:  $\tau 10$  40  $\mu$ M + RNasa A 32 nM; 7: mezcla 6 + RIA7 1 mM; 8:  $\tau 10$  40  $\mu$ M + RNasa A 320 nM y 9: mezcla 8 + RIA7 1 mM. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo con un exceso de péptido para asegurarnos mejor de cuál era su influencia sobre el RNA, de modo que tendríamos hasta 3 tetrámeros de RIA7 por molécula de RNA en cada mezcla de reacción. Para una relación molar mayor se lograron resultados similares.

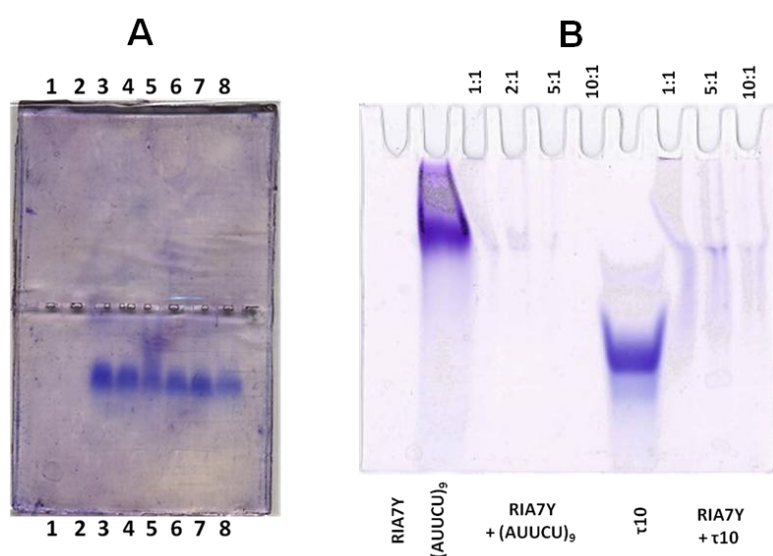
Adicionalmente, con el fin de elucidar el tipo de interacción que tenía lugar, se decidió abordar este tipo de experimentos desde un punto de vista diferente, más novedoso, empleando también la electroforesis en gel de poliacrilamida, pero en esta ocasión realizando el montaje con un soporte en posición horizontal y preparando las muestras en condiciones nativas, en ausencia de urea. Los pocillos se dispusieron en el centro de un gel con un 20% de Ac/Bis-Ac esperando que, en caso de existir cierta interacción con el RNA, el complejo RIA7-RNA obtuviese una carga neta positiva y las bandas observadas tras revelar el gel apareciesen desplazadas hacia la zona donde estuviese el cátodo en la cubeta de electroforesis, habiéndose desplazado en la dirección opuesta a la seguida por el RNA o sus fragmentos, si es que tuviese lugar un proceso de degradación. Se pusieron a prueba diferentes métodos de tinción para poder revelar los resultados de las pruebas realizadas con estos singulares geles (azul de toluidina, tinción con plata y/o Stains-All). Como resultado, tras cargar las mezclas de reacción después de varios días de incubación a temperatura ambiente, obtuvimos un interesante patrón de bandas para el caso de las muestras con RIA7. Lamentablemente el péptido no era detectado de forma visible, probablemente a causa de su carácter catiónico, debido a quedar disperso en el tampón de la cubeta de electroforesis o puede que a causa del grosor de los geles. El RNA sí que era perfectamente visible con cualquiera de los métodos puestos a prueba, por lo que fuimos capaces de descubrir que la mezcla RIA7- $\tau 10$  daba lugar a una banda difuminada a lo largo del desplazamiento de las muestras a través del gel; se detectaba además una disminución de la intensidad para la banda correspondiente al RNA íntegro, lo que no ocurría ni para el caso de +KIA7H-, ni para el caso de las muestras desnaturalizadas por calentamiento 5' a 90 °C (Figura 18A). Es complicado evaluar la contribución de la migración de ambos compuestos por separado, pero la explicación para esta banda difuminada podría encontrarse en un efecto estabilizante, por el



que los complejos ácido nucleico-proteína parecen ser más estables en el gel que en solución. El gel impide la difusión de los compuestos asociados, manteniendo la concentración de complejo y proteína y DNA libres al menos tan alta como en el equilibrio de unión en solución (Lane et al. 1992; Sidorova et al. 2010). Además, la movilidad de los RNAs en el caso de los experimentos PAGE desarrollados en condiciones nativas, estaría favorecida por el mayor plegamiento de los compuestos, promovido a su vez por los cationes presentes en los geles. Los experimentos de PAGE vertical en estado nativo corroboraron los resultados al obtenerse un fondo difuso en el caso del pocillo correspondiente a las muestras de RIA7 con  $\tau 10$ , quedando en el gel una banda intensa a una altura mayor que la banda dibujada por la muestra que únicamente contenía el RNA.

En presencia de un ácido nucleico de estructura menos usual, como es el caso de  $(AUUCU)_9$ , el patrón de bandas no seguía este comportamiento, por lo que pudimos comenzar a deducir la existencia de cierta especificidad del péptido RIA7 por RNAs con una estructura correctamente definida (Figura 18B). En cualquier caso, la interacción entre péptido y RNA  $\tau 10$  para dar lugar a un complejo de mayor tamaño quedó así demostrada, dando sentido a la turbidez y formación de cierto precipitado observados a la hora de preparar las muestras. Según los geles resultantes, o bien estos agregados poseían una carga neta positiva, o bien eran retenidos por el tamaño de poro de las construcciones e iban perdiendo poco a poco las moléculas de péptido unidas al RNA, permitiendo su avance hacia el ánodo y generando la banda difusa observada. Es por ello que fueron necesarias pruebas complementarias para aclarar las dudas surgidas en lo concerniente a la estequiometría de la interacción entre ambas moléculas.

**Figura 18.** Geles nativos de PAGE al 20% horizontal (izquierda) y vertical (derecha). **A)** 1: +KIA7H- 22  $\mu$ M; 2: RIA7 22  $\mu$ M; 3 y 6: RNA  $\tau 10$  227  $\mu$ M; 4 y 7: +KIA7H- 182  $\mu$ M +  $\tau 10$  114  $\mu$ M; 5 y 8: RIA7 182  $\mu$ M +  $\tau 10$  114  $\mu$ M. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y las alícuotas correspondientes a los pocillos 6, 7 y 8 fueron calentadas previamente 5' a 90 °C,



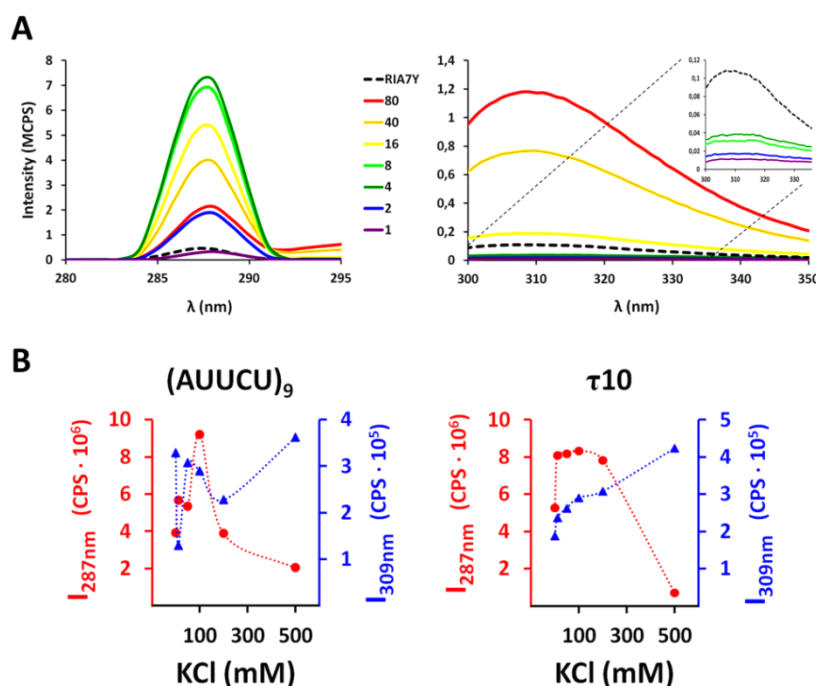
y 8 fueron calentadas previamente 5' a 90 °C, dejando que se enfriasen a temperatura ambiente antes de cargarlas en los pocillos del gel. **B)** Las concentraciones finales cargadas en el gel fueron de 500, 50 y 48  $\mu$ M para RIA7,  $(AUUCU)_9$  y  $\tau 10$ , respectivamente. Las mezclas de reacción 1:1 llevan RIA7 353  $\mu$ M,  $(AUUCU)_9$  9  $\mu$ M o  $\tau 10$  11  $\mu$ M, es decir, 9-10 tetrámeros de RIA7 por molécula de RNA. Los siguientes pocillos, contienen 2, 5 o 10 veces la concentración de RIA7 que hay en el nombrado como pocillo 1:1. Se puede apreciar fácilmente como las bandas de  $\tau 10$  en presencia del péptido RIA7 se difuminan y sufren un retraso mayor durante el desplazamiento que el observado en el caso de la banda correspondiente al RNA por separado, lo cual no ocurre en los pocillos con las muestras con  $(AUUCU)_9$ .

#### 4.2.2. Detección de agregación mediante espectrometría de fluorescencia

En vista de los resultados observados tras los experimentos de PAGE, fueron necesarios métodos complementarios para poder conocer con más detalle qué tipo de interacción tenía lugar entre el péptido RIA7 y los RNAs. Además, se trató de encontrar evidencias claras de la formación de agregados que parecía tener lugar entre dichos compuestos, en lugar de presenciarse los fenómenos de catálisis de la degradación de los RNAs con la eficacia observada en el caso de sus homólogos con Lys. Para conseguir esto, se hizo uso de la espectrometría de fluorescencia. Se realizaron medidas de intensidad de la fluorescencia detectada, tanto para las longitudes de onda de excitación (es decir, la dispersión de luz a 90°), como para las longitudes de onda de emisión características de los residuos aromáticos de Tyr ( $\lambda_{\text{Ex}} = 287 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{Em}} = 309 \text{ nm}$ ) presentes en el péptido. El procedimiento utilizado se puede encontrar en el apartado 8.4.1. Ya que el RNA no presenta fenómenos de fluorescencia, la señal detectada era exclusivamente debida a los residuos de Tyr de RIA7. De este modo, en caso de que existiese difracción, estaría causada por la formación de agregados (Benjwal et al. 2006).

Para preparar las diferentes series de muestras, elegimos un rango de condiciones teniendo en cuenta el número de cargas presentes en cada molécula: 4 cargas positivas por molécula de RIA7, 12 por tetrámero; 47 cargas negativas (debido a que el primer NTP añadido mantiene sus grupos fosfato) para el RNA (AUUCU)<sub>9</sub> y 27 cargas negativas por molécula de RNA  $\tau 10$ , con 25 nt. De este modo, según la relación de cargas, las distintas mezclas estequiométricas RIA7:RNA puestas a prueba fueron aproximadamente las siguientes: 1:0, 40:1, 20:1, 8:1, 4:1, 2:1, 1:1 y 1:3, o lo que es lo mismo, se pusieron a prueba diferentes condiciones experimentales que van desde 1 hasta 125 tetrámeros de RIA7 por molécula de RNA (Figura 19A). Como resultado, se pudo observar que el mayor grado de agregación parecía detectarse cuando la relación de cargas entre el péptido y el RNA se encontraba entre 2 y 4 cargas positivas por cada carga negativa. La formación de agregados, para las muestras en las que la concentración de péptido era mucho más alta que la concentración de  $\tau 10$  (80, 40 y 16 tetrámeros por molécula de RNA), era menor a la detectada cuando la concentración alcanzaba la estequiometría óptima para la generación de los aductos (4-8 tetrámeros por molécula de RNA). Este hecho nos daba a entender que la agregación detectada era debida a la interacción entre ambos componentes y no estaba causada por partículas formadas por ellos de manera independiente. Parece ser que la interacción entre RIA7 y el RNA  $\tau 10$  no era debida únicamente a fuerzas electrostáticas, sino que habría que tener en cuenta también otro tipo de interacciones, tales como interacciones hidrófobas o fenómenos de apilamiento con las cadenas laterales de los residuos que forman parte del péptido.

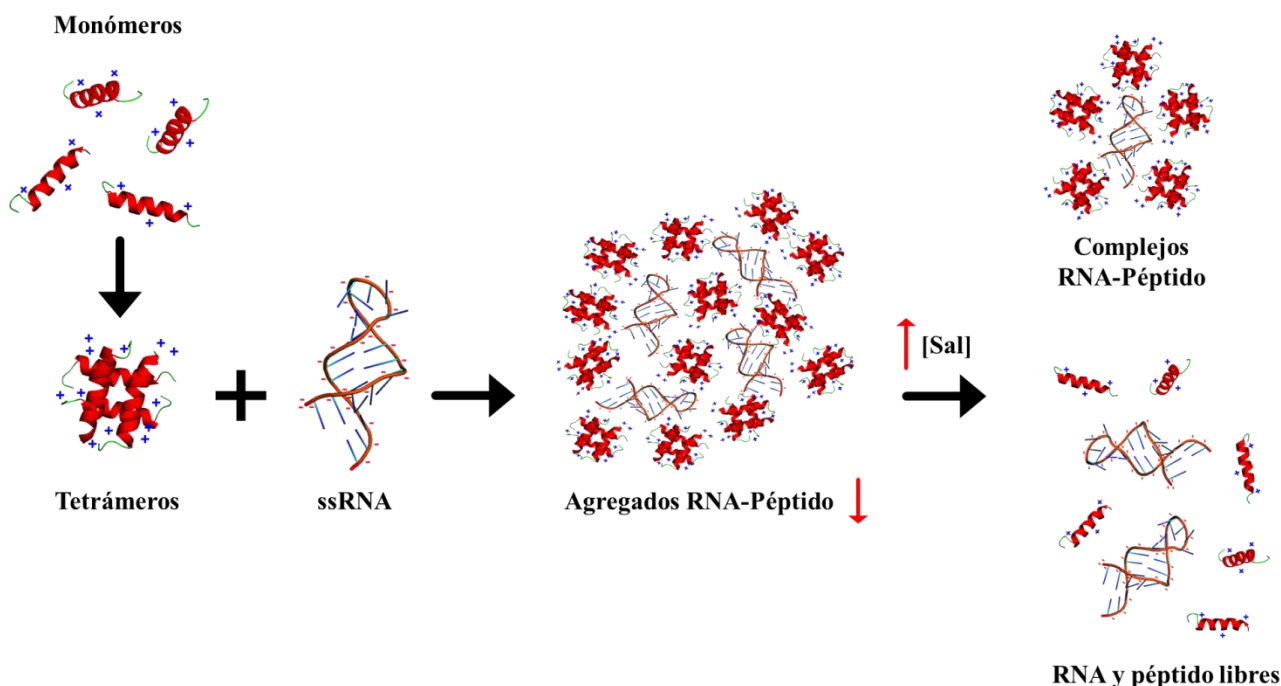
Con el fin de despejar las posibles dudas al respecto, se realizaron pruebas similares en presencia de concentraciones crecientes de KCl (Hofmeister 1888; Green 1931; Green 1932; Melander and Horvath 1977; Kunz et al. 2004; Hirano et al. 2007). Así, se pudo comprobar que a pesar de reducir el efecto electrostático de las interacciones entre el péptido y los RNA, a causa del apantallamiento ejercido por los iones disueltos, la formación de agregados continuaba siendo patente hasta  $[KCl] = 100$  mM. Esto demuestra la gran estabilidad de los aductos y sugiere la existencia otro tipo de interacciones de unión amén de las puramente electrostáticas (Figura 19B). Los experimentos se realizaron tanto para el RNA  $\tau 10$ , con estructura en horquilla, como para  $(AUUCU)_9$ , con una conformación menos definida. Aunque en los ensayos de fluorescencia iniciales no existía ninguna diferencia relevante entre las muestras con un ácido nucleico u otro, en las pruebas diseñadas en presencia de concentraciones variables de sal sí que se apreciaban cambios en los espectros resultantes.



**Figura 19. A)** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 287$ ) que muestran la interacción entre RIA7 y RNA  $\tau 10$  en el caso de muestras con distinta cantidad de tetrámeros del péptido por molécula de RNA, medidos a 25 °C. La concentración de RIA7 tomada como referencia (en mezclas de reacción de 1 a 8 tetrámeros por cada ácido nucleico y en la muestra con solo RIA7) fue de 53  $\mu\text{M}$  y las disoluciones se realizaron en tampón KPi 10 mM pH 7. La presencia de agregados (izquierda) es detectada al observar que existe dispersión de luz a 90° y la fluorescencia de los residuos de Tyr del péptido es detectada a una longitud de onda de 309 nm (derecha). De forma complementaria, este mismo tipo de experimentos se llevaron a cabo usando el RNA  $(AUUCU)_9$ , con un plegamiento menos común, observándose resultados similares (Diez-García et al. 2012).

**B)** Intensidad detectada a 287 nm (fracción en agregación, en rojo) y 309 nm (fracción libre, en azul) durante los experimentos de fluorescencia de RIA7, con  $(AUUCU)_9$  y  $\tau 10$  en presencia de concentraciones crecientes de KCl, a 25 °C y con tampón KPi 10 mM pH 7. La estequiometría de las mezclas de reacción era de 4 tetrámeros de péptido por molécula de RNA. En esta ocasión podemos observar diferencias notables entre ambos RNAs, de lo que se deduce cierta especificidad por el RNA más estructurado a la hora de la formación de los agregados. En ambos casos, las medidas se tomaron en un rango de 260-350 nm, cada 1 nm, con un tiempo de integración de 0,2 s/nm y una apertura para las rendijas de entrada y salida de 3 mm.

Teniendo en cuenta que la unión a RNAs ocurriría cuando el péptido se encontrase en su forma tetramérica específicamente plegada y no en su forma monomérica, en vista de las señales correspondientes a la formación de agregados, se podría deducir que era a bajas concentraciones de sal (0-200 mM) cuando la formación de los tetrámeros se encontraba más favorecida. Es por ello que la formación de agregados incrementaba de forma significativa desde bajas concentraciones hasta concentraciones de KCl mayores de 200 mM para ambos ácidos ribonucleicos, observándose una mayor facilidad para la formación de los complejos en el caso de  $\tau 10$ , que presenta máximos de agregación a concentraciones de sal inicialmente menores. Para la concentración máxima de sal añadida (500 mM), la presencia de agregados disminuía drásticamente en ambas muestras, incluso por debajo de la detectada en ausencia de sal, probablemente debido a la completa neutralización de la nube de cargas presente en los complejos y el apantallamiento total de las interacciones electrostáticas entre péptido y RNAs. Así, tras monitorizar la tendencia seguida por la intensidad de la señal de fluorescencia correspondiente a (AUUCU)<sub>9</sub>, se demostró que las fracciones de tetrámeros de RIA7 libre y formando agregados fluctuaban a medida que se formaban los complejos con el RNA mientras la concentración de sal permanecía baja, para después alcanzar concentraciones de sal tan elevadas que prevenían la formación de los tetrámeros y, por consiguiente, también la de los complejos. Parecía existir un equilibrio entre tetrámeros en agregación y tetrámeros libres, debido a una unión débil que se veía afectada por los cambios en la red iónica del medio. Por el contrario, en el caso de  $\tau 10$ , con un plegamiento estable y bien definido, se pudo observar una tendencia hacia la formación de agregados mucho más estables, cuya proporción se mantenía desde la adición de pequeñas cantidades de sal, lo que favorecía la disposición de RIA7 en forma de oligómeros. Cuando la concentración de sal era demasiado alta, esta predilección por adoptar la disposición tetramérica desaparecía y la formación de complejos era neutralizada, detectándose entonces la fluorescencia correspondiente a casi todo el péptido libre presente en la disolución en su forma monomérica. Se puso de manifiesto que la formación de los tetrámeros y agregados, además de venir definida por las interacciones electrostáticas entre los compuestos, se veía también influenciada por la estabilidad de la conformación tetramérica helicoidal de RIA7 y la correcta estructuración de los RNAs, detectándose una unión más estable entre los péptidos RIA7 y ácidos nucleicos de conformación más definida (Figura 20).

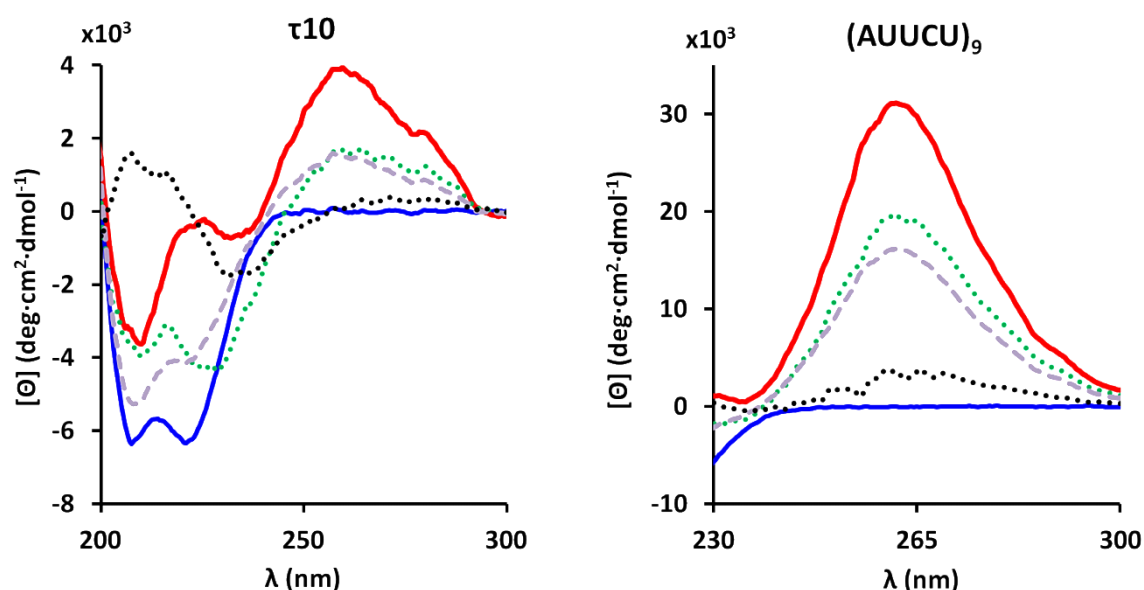


**Figura 20.** Esquema que ilustra el comportamiento de los péptidos RIA7 (rodeados de cargas positivas), que dan lugar a las estructuras tetraméricas helicoidales en forma de X y que al interactuar con RNAs monocatenarios de estructura definida, como es el caso de  $\tau 10$  (representado en la imagen rodeado de cargas negativas), forma agregados que precipitan, hasta que la concentración de sal en el medio es lo suficientemente grande como para producir su escisión, obteniéndose por un lado parte de los complejos péptido-RNA formados y, por el otro, moléculas de RNA y péptido en su forma monomérica. Habría que prestar especial atención a la estequiometría de formación de los complejos y agregados y a la carga neta que estos adquirirían, la cual se ha hecho patente a lo largo de todos los experimentos de PAGE llevados a cabo.

#### 4.2.3. CD: interacción con RNAs de estructura definida

Los experimentos de dicroísmo circular, además de permitirnos comparar la correcta estructuración de las hélices de RIA7 respecto a la de sus homólogos con Lys, sirvieron también para corroborar la presencia de agregación entre péptidos y RNAs, tanto en presencia como en ausencia de diferentes concentraciones de sal. Al mismo tiempo, se pudo detectar la interacción con los RNAs y la formación de agregados, a pesar de la ya conocida dificultad que entrañan dichos experimentos en presencia de precipitados, los cuales hacen más difícil discernir con claridad entre fenómenos de interacción y fenómenos de agregación (Mascotti and Lohman 1997). Al contrario de lo observado en recientes publicaciones acerca de diferentes ARMs de importancia biomédica (Bayer et al. 2005), para el caso de los tetrámeros helicoidales estudiados, no parece existir una adaptación “camaleónica” del plegamiento de los péptidos para permitir la interacción con los ácidos nucleicos según cual sea su estructura. En los experimentos con RIA7, además de detectarse cambios

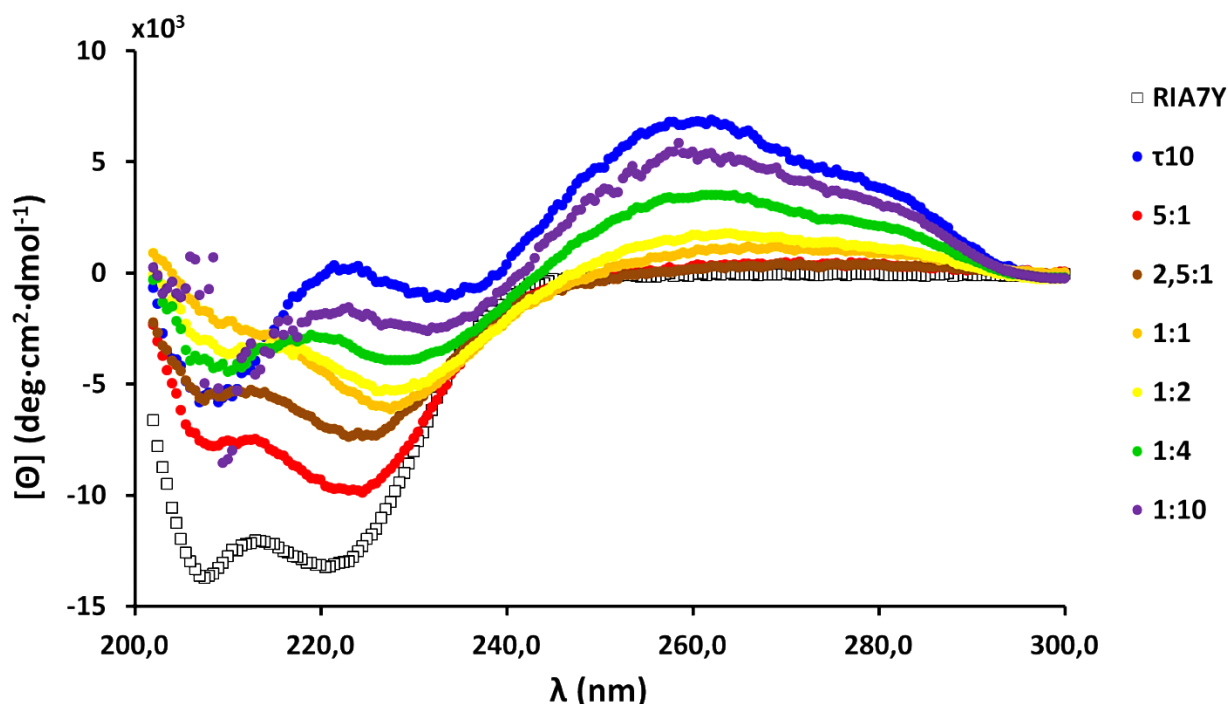
atribuidos a los RNAs, se detectaron también variaciones en las señales correspondientes al péptido; la interacción entre ambos compuestos no ocurría al estar estos en su forma extendida, sino que mantenían en cierta medida su correcto plegamiento inicial. Tanto en el caso de la interacción con  $\tau 10$ , como en los resultados obtenidos para la mezcla RIA7 con  $(AUUCU)_9$ , las curvas espectrales generadas diferían de las predicciones correspondientes que se pudieron calcular a partir de los valores detectados durante los experimentos con ambos compuestos de forma aislada (Figura 21). Al comparar el patrón de elipticidad molar de la suma de los espectros que se obtenían por separado con el seguido por los valores experimentales de las mezclas de reacción, encontrábamos similitudes en la región correspondiente al RNA, pero existían discrepancias entre los espectros calculado y experimental a las longitudes de onda correspondientes a la presencia de péptido helicoidal. Puesto que los experimentos fueron llevados a cabo con un ligero exceso de RNA respecto de la concentración final de RIA7 (al menos dos moléculas de RNA por tetrámero), con el fin de discriminar mejor entre interacción y agregación, estos resultados indicaban que la diferencia en los cambios observados alrededor de los 220 nm eran debidos a la interacción entre RIA7 y los ácidos ribonucleicos.



**Figura 21.** Espectros UV de CD de RIA7 100  $\mu$ M (línea continua azul); RNA  $\tau 10$  o  $(AUUCU)_9$  48  $\mu$ M (línea continua roja); mezcla de reacción con RIA7 100  $\mu$ M y RNA 48  $\mu$ M (línea discontinua verde); cálculo de la suma de los espectros del péptido y el RNA por separado (línea discontinua gris); diferencia entre los valores de la mezcla experimentales y calculados (línea discontinua punteada negra). Los valores del eje de ordenadas se encuentran expresados en unidades de elipticidad molar. El péptido presenta el espectro típico de estructuras en hélice  $\alpha$ , mientras que el RNA parece tener una forma espectral representativa de conformaciones en horquilla con un dominio bicatenario de tipo A (Hung et al. 1994; Kypr et al. 2009). En el caso de las muestras en presencia de  $(AUUCU)_9$ , se prefirió omitir la parte correspondiente a los valores de elipticidad característicos del péptido ya que, en este caso, al tratarse de un RNA de mayor tamaño, con una intensa absorbancia, para la misma concentración de  $\tau 10$  existía demasiado ruido de fondo como para considerar fiables los valores obtenidos en esa franja de  $\lambda$  y el voltaje alcanzado podía llegar a dañar el espectropolarímetro. En cualquier caso, se observa el mismo comportamiento descrito en el caso de las medidas de las muestras con  $\tau 10$  (Diez-García et al. 2012).

Como se ha dicho, era complicado realizar hipótesis basadas en este tipo de espectros de CD, ya que habría que tener en cuenta otros muchos aspectos como la precipitación de los agregados o un apantallamiento de la señal entre compuestos. En esta ocasión se intentó evitar esto al seleccionar una estequiometría de reacción que permitiese la interacción entre péptidos y RNA, generándose complejos y también agregados, aunque no de forma mayoritaria. En los experimentos de CD con proporciones de péptido respecto de RNA óptimas para la agregación, se pudo observar perfectamente como la señal correspondiente a los tetrámeros helicoidales era más clara a medida que disminuía la concentración de  $\tau 10$ , cuya señal sí se veía reducida, pero en ninguno de los casos alcanzaba los valores hallados para los compuestos de forma aislada. Esto significaba que se detectaban las señales tanto del RNA existente en la muestra como del péptido libre o unido, que aún no se encontraba formando parte de los agregados. Es por ello que, a pesar de contar siempre con la misma concentración de RIA7 en todas las muestras, la forma de los espectros entre los datos calculados y los experimentales era diferente. Concretamente, las diferencias más evidentes se observaron en el caso de la región correspondiente al patrón dibujado por las estructuras helicoidales y también en los valores máximos de elipticidad molar a 260 nm, cuyo valor máximo fue detectado en las muestras de RNA por separado y no se alcanzó de nuevo, aunque en algunas de las muestras la concentración de RNA fuese mayor (Figura 22). Aunque se detecte un cambio en el espectro del RNA  $\tau 10$  por la interacción con RIA7, el plegamiento del mismo se mantiene en cierta medida y las variaciones observadas sugieren que parte de la doble hélice de RNA pasa de la forma A a la B en presencia del péptido. Además, en los experimentos con (AUUCU)<sub>9</sub>, un RNA de estructura menos definida, observamos que en las muestras con RIA7 se detectaba una mayor elipticidad a 260 nm. Se puede deducir entonces que el conjunto de conformaciones detectado para el RNA adoptaría una conformación más desplazada hacia una forma A de la doble hélice en presencia del péptido.

Cabe destacar que en los ensayos de desnaturalización térmica llevados a cabo para los distintos RNAs utilizados no se observaron cambios relevantes en los valores de elipticidad molar obtenidos, antes y después de la renaturalización, es decir, que dichos RNAs presentaban una desnaturalización reversible. Durante estos experimentos se emplearon los mismos parámetros de barrido usados en los ensayos con RIA7, a excepción de que la señal era detectada a 260 nm y el intervalo de temperaturas monitorizado iba desde -2 a 75 °C.



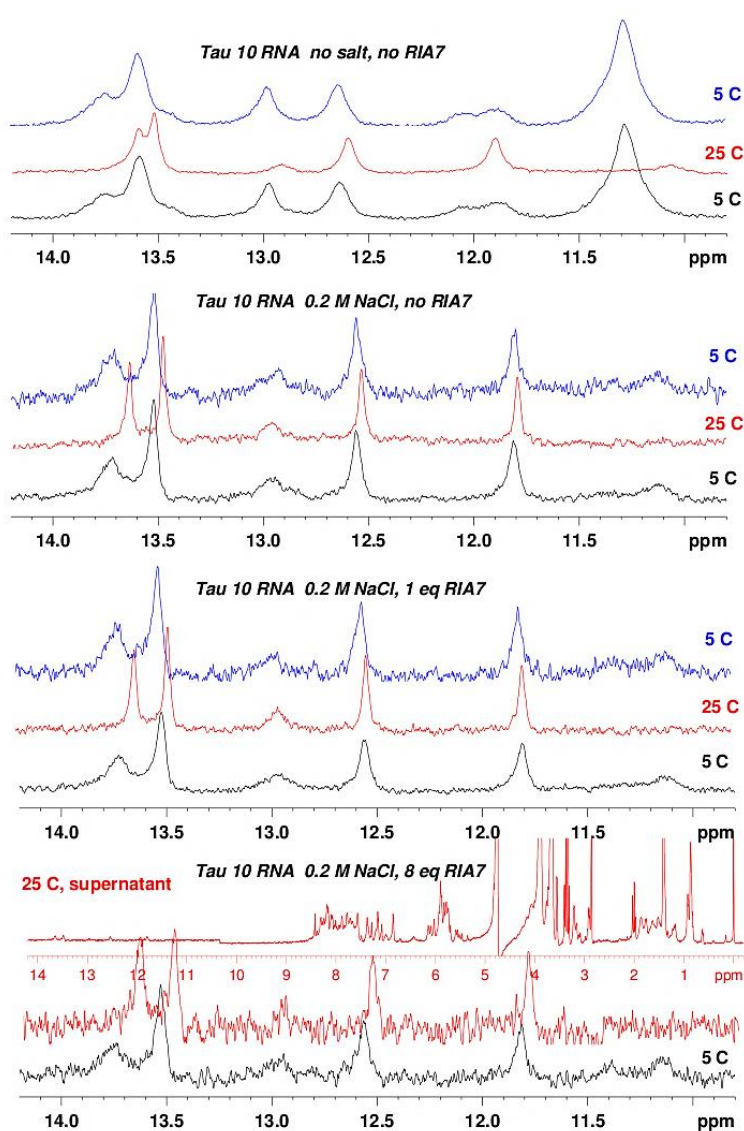
**Figura 22.** Espectros de CD observados para muestras de RIA7 + RNA  $\tau$ 10 a diferentes relaciones molares, teniendo en cuenta una concentración tetramérica fija de 25  $\mu$ M. La concentración del RNA por separado es de 48  $\mu$ M, el doble que en el caso de la muestra con estequiometría 1:1. Los ensayos se realizaron a 25 °C en tampón H/NaAc 10 mM pH 5. Se puede apreciar como, aun superando en diez veces la concentración de péptido presente, cinco veces la concentración de la muestra solo con  $\tau$ 10, no se alcanzan los mismos valores que en este último caso, a causa de la agregación y el promediado de las señales del RNA y el péptido (Diez-Garcia et al. 2012).

#### 4.2.4. Monitorización por RMN de las moléculas de RNA libres y en los aductos

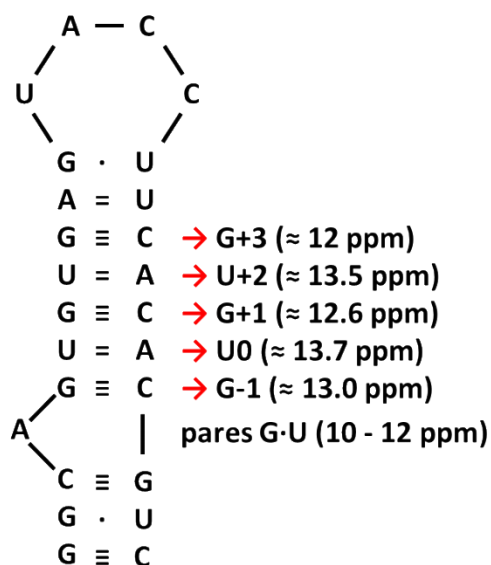
Contemplando la posible existencia de un equilibrio entre las moléculas de RIA7 y RNA libres en disolución, las que se encuentran unidas entre sí y las que dan lugar a agregados que precipitan, se diseñó una serie de experimentos de espectroscopia de RMN monodimensional para comprobar qué especies se encontraban mayoritariamente disueltas en las muestras, cuáles formaban parte de las partículas que provocaban la turbidez observada y cuál era la composición del sobrenadante que quedaría tras centrifugarlas. Los espectros de las muestras analizadas mostraron que la presencia de sal (NaCl 200 mM) altera la región bicatenaria de la horquilla del RNA  $\tau$ 10, perdiéndose las señales correspondientes a los pares G=U, menos estables. La adición de RIA7 a las muestras de RNA con sal no modificaba los espectros, de modo que la estructura de  $\tau$ 10 no se veía afectada, tal y como se había deducido tras observar los gráficos resultantes de los experimentos de CD. Sí que existía un ligero desplazamiento en las señales al comparar los espectros de los



experimentos realizados a 25 °C con los llevados a cabo a 5 °C, temperatura a la cual el RNA parece encontrarse algo mejor estructurado. Al analizar el sobrenadante recogido tras la centrifugación de muestras con un exceso de RIA7 (aproximadamente 2 tetrameros por molécula de RNA), encontramos las mismas señales detectadas en los experimentos iniciales, correspondientes a los puentes de hidrógeno formados entre los pares de bases de  $\tau 10$ ; también se observaron las señales propias del péptido RIA7, tanto en su forma plegada como desplegada (Figura 23). Estos resultados eran consistentes con la idea de que el RNA  $\tau 10$  se unía a la forma tetramérica y específicamente plegada de RIA7 y no a su forma monomérica y desplegada, tal y como se observó en los ensayos en presencia de iones, dependiendo de la densidad de carga positiva presente en la superficie de tetrameros y monómeros (Lohman et al. 1980).



**Figura 23.** A la izquierda, los espectros 1D de RMN del RNA  $\tau 10$  en tampón D/NaAc 10 mM pH 5, con DSS 50  $\mu$ M, en presencia de NaCl 200 mM y RIA7 a una concentración equivalente a la del RNA en determinadas muestras, a 5 y 25 °C. Los espectros de la base pertenecen a la muestra con una concentración de péptido 8 veces superior a la del RNA presente, centrifugada para que los agregados formados precipitasen en el fondo del tubo de resonancia. Se puede observar como el aumento de la temperatura conlleva la desaparición de algunas de las señales propias de protones imino formando puentes de hidrógeno entre los pares de bases de  $\tau 10$  (bajo estas líneas), las cuales se recuperan de nuevo al regresar a la temperatura inicial (Varani et al. 1999; Díez-García et al. 2012).



### 4.3. Residuos aromáticos terminales en el diseño de péptidos

Continuando en esta línea, el siguiente objetivo sería el de estudiar en qué medida y de qué manera influía la presencia de residuos aromáticos en el extremo C-terminal de este tipo péptidos pequeños en lo que concierne a la estabilidad y estructuración de los mismos. Para llevar a cabo los ensayos pertinentes se eligió el péptido KIA7I, el único de la serie KIA7 que carecía de este tipo de residuos en esa posición terminal y poseía cierta conformación tetramérica helicoidal, aunque solamente en presencia de altas concentraciones de sal. Al mismo tiempo se analizaron otros péptidos poco o nada estructurados de la misma familia para corroborar los resultados obtenidos. Enfocando esta idea desde el punto de vista de la abiogénesis, se tuvo en cuenta la existencia de pequeñas ribozimas que emplean aminoácidos como cofactores (Roth and Breaker 1998; Szathmary 1999; Turk et al. 2010), logrando aumentar así sus capacidades catalíticas. Es lógico pensar que lo mismo podría haber sucedido con péptidos como KIA7I, compuestos aromáticos sencillos y RNAs en un mundo primordial. La idea era averiguar si una Ile, junto con alguna clase de areno, podría llegar a ocupar el lugar de un aminoácido aromático en este tipo de moléculas sin comprometer su integridad estructural. Por ello, llevamos a cabo experimentos análogos a los realizados con el péptido KIA7I pero, en esta ocasión, incluyendo en las pruebas realizadas la presencia de diferentes arenos (fenol, anilina, anisol, naftaleno, o-xileno, p-xileno, tolueno y benceno). Con ello comprobaríamos si gracias a la interacción con compuestos cíclicos sencillos la estructura de KIA7I podía asemejarse de algún modo a la de sus homólogos más estables. Como se mencionará de forma más detallada a continuación, la interacción entre estos péptidos sencillos y los hidrocarburos aromáticos más simples ayudó también a dilucidar mejor la influencia que tienen dichos componentes sobre las proteínas con dominios parcialmente desplegados, además de los ya de sobra conocidos efectos nocivos sobre los ácidos nucleicos que poseen algunos de sus metabolitos (Sabbioni 1994; Wang et al. 2012).



**5. KiA7i**



Como objetivo siguiente, comenzamos con los ensayos de caracterización estructural que nos permitiesen definir de forma clara cuál era el comportamiento conformacional predominante en este compuesto. Como se ha mencionado en el apartado 3.2, KIA7I presentaba curvas de CD típicas de proteínas desplegadas pero daba lugar a estructuras de “four helix bundle” en presencia de altas concentraciones de sal. Una vez conocida la conformación que adopta en el espacio, nos centraríamos en los ensayos sobre su interacción con diferentes arenos, para poner a prueba la importancia de los grupos aromáticos C-terminales en lo referente a la estabilidad del plegamiento de estos péptidos presuntamente prebióticos.

## 5.1. Caracterización estructural: tetrámeros y extremos C-terminales libres

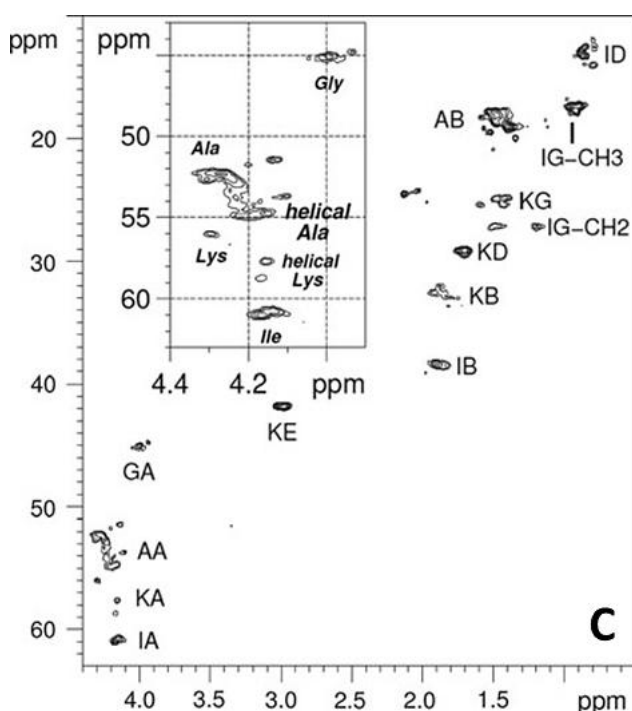
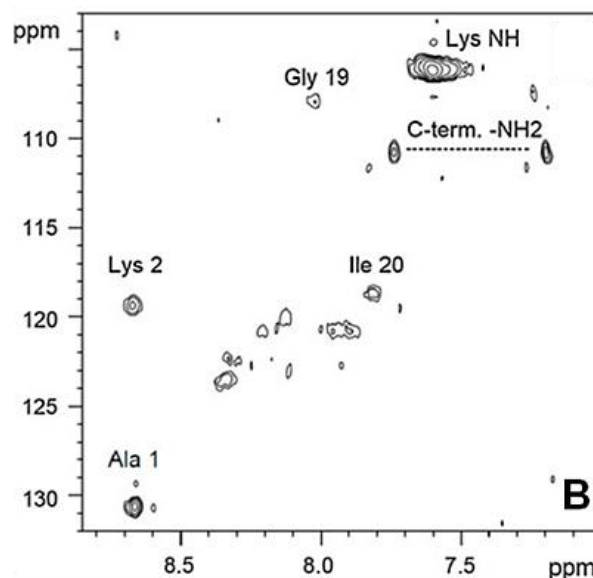
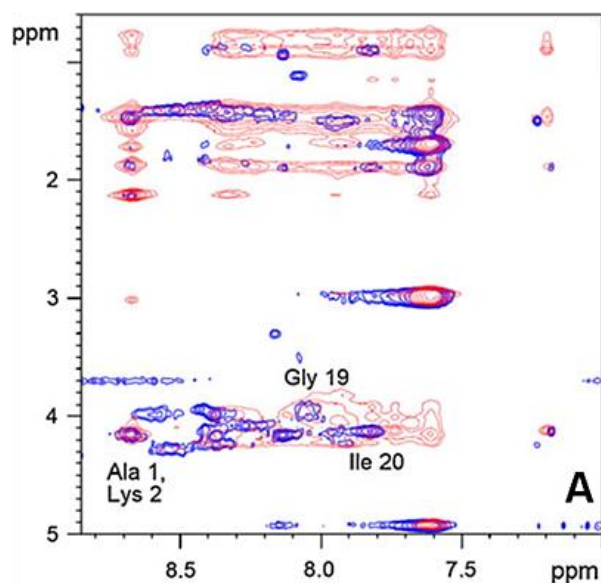
Durante los estudios sobre los péptidos KIA7, ensayos preliminares de KIA7I mostraron que presentaba una conformación parcialmente desplegada, a menos que se monitorizase el péptido en presencia de un agente estabilizante, como por ejemplo el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , que aumentaba el efecto hidrófobo del medio favoreciendo la estructuración del péptido (Hofmeister 1888). Sabiendo esto, la mayoría de los ensayos experimentales llevados a cabo para elucidar el comportamiento del plegamiento de KIA7I se realizaron en presencia de altas concentraciones de sal.

### 5.1.1. Poca dispersión en espectros de RMN

Usando equipos Bruker (600 MHz y 800 MHz) se adquirieron espectros 1D  $^1\text{H}$ , 2D TOCSY ( $\tau_m = 60, 80$  y  $100$  ms), 2D NOESY ( $\tau_m = 80$  y  $150$  ms) y 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de KIA7I, tanto en 100%  $\text{D}_2\text{O}$  como en 90%  $\text{H}_2\text{O}/10\%$   $\text{D}_2\text{O}$  y a una concentración de péptido de entre 1,0 y 2,5 mM. Con el fin de reducir el apantallamiento de los pulsos, causado por los efectos electrostáticos ejercidos por los iones de las sales, en la mayoría de los casos se emplearon tubos de 3 mm de diámetro. Los espectros TOCSY y NOESY de KIA7I iniciales mostraban una disminución considerable en la dispersión de las señales y existía mucho solapamiento entre ellas, en comparación al conjunto de resonancias obtenidas en los espectros de variantes más estables y con estructuras mejor definidas, tales como los péptidos KIA7 con residuos aromáticos o el péptido RIA7

descrito en el capítulo anterior. Aproximadamente la mitad de las Ala y dos de cada tres residuos de Lys tenían valores de desplazamiento químico para  $^1\text{H}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$  y  $^{13}\text{C}\beta$  característicos de estructuras helicoidales y que se alejaban de los valores típicos de estructuras en hebras  $\beta$ , lazos u ovillo estadístico (Wishart et al. 1991) (Apéndice 4), lo cual también había podido vislumbrarse en los espectros de CD en presencia de altas concentraciones de sal (López de la Osa et al. 2007). Por ejemplo, Lys 2 presentaba unos valores de  $\delta$  para  $^{13}\text{C}\alpha$  (57.7 ppm) y  $^1\text{H}\alpha$  (4.16 ppm) en el rango de los desplazamientos químicos típicos de una hélice  $\alpha$ , aunque algo más bajos que los valores intrínsecos de referencia en el caso de las señales de  $^1\text{H}\alpha$ . Ello indicaría la formación de una estructura helicoidal parcial (20 - 40%). No obstante, las resonancias de  $^1\text{H}\alpha$  y  $^1\text{H}\alpha'$  de Gly 18 estaban degeneradas, al contrario de lo que ocurre con las variantes más estables, donde se detectaban bien diferenciadas con valores de 0.64-0.67 ppm en KIA7Y, KIA7F, KIA7H y RIA7, y de hasta 0.99 ppm en KIA7W. Esta pérdida de singularidad en los desplazamientos químicos es una buena evidencia para poder asegurar que la estructura de giro, adoptada por la Gly 18 de manera tan específica en las otras variantes de KIA7, no es algo predominante en el caso de KIA7I. Según estos resultados, la Ile C-terminal se encontraría desordenada y por lo tanto sería incapaz de ocupar el bolsillo hidrófobo, ocupado por la cadena lateral de los residuos aromáticos en los derivados más estables. Además, al no encontrarse suficientes NOEs típicos de hélices  $\alpha$  ( $^1\text{HN}-^1\text{HN}_{(i,i+1)}$ ,  $^1\text{HN}-^1\text{H}\beta_{(i,i+1)}$  o  $^1\text{HN}-^1\text{H}\alpha_{(i,i+1,3,4)}$ ), la estructura no podía determinarse con total seguridad (Diez-García et al. 2011).

Los espectros de HSQC fueron de gran ayuda a la hora de asignar las resonancias de los distintos sistemas de espín correspondientes a Ala, Ile, Lys y Gly, aunque el solapamiento de algunas de las señales en la mayoría de las ocasiones dificultaba la asignación de los residuos de forma individual (Figura 24). Gracias a los cálculos de MD detallados más adelante, sabemos que esto es debido a la mayor diversidad estructural que KIA7I presenta con respecto a KIA7Y, F, W o H, al tener la Ile C-terminal mayor libertad de movimiento y al no poseer ningún residuo aromático para inducir cambios en protones cercanos por la deslocalización de electrones  $\pi$  cuando se aplica el campo magnético.



**Figura 24.** **A)** Espectros 2D TOCSY (azul,  $\tau_m = 80$  ms) y 2D NOESY (rojo,  $\tau_m = 150$  ms). Las señales marcadas corresponden a los desplazamientos químicos generados entre los protones  $^1\text{H}_\alpha$  y los  $^1\text{H}_\text{N}$  de los residuos indicados. Se puede observar un solapamiento evidente entre las señales como ocurre, por ejemplo, en el caso de Ala 1 y Lys 2. **B)** Espectro 2D de RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC en abundancia natural de KIA71, de gran utilidad para poder asignar de forma individual algunas de las señales que presentaban solapamiento en el resto de experimentos de RMN, como es el caso de la Ala 1 y la Lys 2 mencionadas anteriormente. La resonancia observada a 7.6 ppm corresponde a la resonancia solapada de los  $^1\text{H}_\text{N}$  de los residuos de Lys. A pesar del prolongado tiempo de adquisición con que se llevó a cabo este experimento (2 días), no se detectaron todas las señales que se esperaban encontrar, muy probablemente debido a la baja abundancia natural del isótopo de nitrógeno en la muestra. **C)** Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de KIA71 en abundancia natural. Los picos se muestran según un código de dos letras: la primera indica el tipo de aminoácido y la segunda el átomo que posee ese desplazamiento químico. Algunos de los NOEs entre  $^1\text{H}_\alpha$  y  $^{13}\text{C}_\alpha$  de Ala y Lys del recuadro sí que presentan  $\delta$  propios de estructuras en hélice  $\alpha$ . Los espectros fueron adquiridos a partir de muestras de KIA71 1,0 - 2,5 mM, en 0,50 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , a pH 5 y 5° C, en un tampón D/NaAc 10 mM y 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ . Como referencia para establecer el punto en 0 ppm y estándar interno para el resto de  $\delta$  se empleó DSS 50  $\mu\text{M}$  (Diez-García et al. 2011).

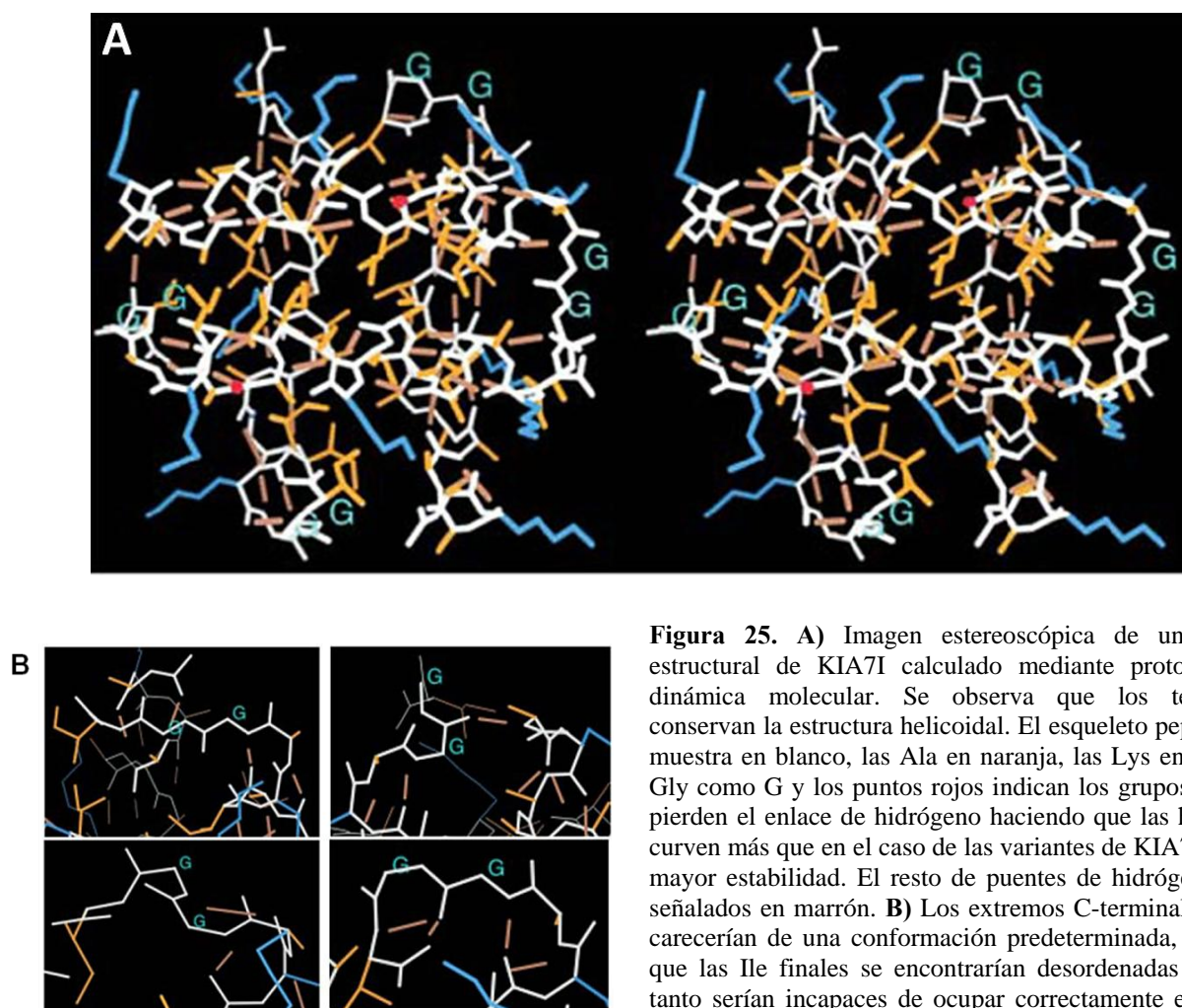


### 5.1.2. Dinámica molecular: extremos C-terminales con estructura aleatoria

Ante la imposibilidad de realizar cálculos estructurales a partir de los espectros de RMN con la fidelidad deseada, se recurrió a cálculos de dinámica molecular para elucidar el comportamiento estructural del péptido KIA7I y monitorizar la evolución de las estructuras mayoritaria y energéticamente más favorables. Para ello, tal y como se resume en el apartado 8.6.2, se emplearon el paquete de modelado SYBYL-X y el software AMBER v11 (Case et al. 2005). Inicialmente se obtuvo un conjunto de 10 modelos estructurales de KIA7I basándonos en las estructuras de KIA7Y (PDB: 2jo4), elucidadas en los trabajos anteriores mediante RMN. Este péptido ya ha sido utilizado también por los creadores de TALOS+ en la optimización de SPARTA+, un software dedicado a la predicción de desplazamientos químicos a partir de los datos de ángulos de torsión y secuencias homólogas recogidas en una base de datos generada a partir de las coordenadas extraídas del PDB. Hecho esto, se crearon modelos para cada estructura, acompañados de los contraiones correspondientes, sometidos a 1000 etapas de minimización de energía en vacío usando un límite de distancia de 10 Å, es decir, despreciable. Más tarde, se “hidrataron” las estructuras añadiendo moléculas de H<sub>2</sub>O a los modelos, de forma que se añadieron 6800 moléculas de agua del tipo TIP3PBOX en una “caja” de dimensiones 60 x 65 x 60 Å. En esta ocasión, se continuaron consolidando las condiciones de minimización de energía, realizándose 5000 etapas de minimización hasta que la desviación cuadrática media de los gradientes de energía fuese menor de 0,1 kcal·mol<sup>-1</sup>·Å<sup>-1</sup>. De este modo, se intensificaron las etapas de minimización de la energía (10000 pasos de dinámica molecular de 0,002 ps) hasta alcanzar un equilibrio energético a lo largo de 1,3 ns para cada uno de los diez modelos estructurales de partida. Con el fin de controlar la eficiencia de los cálculos estructurales durante el proceso, cada cierto tiempo se almacenaban los resultados obtenidos y se analizaban usando los programas MolMol (Koradi et al. 1996) y Mage (Richardson and Richardson 1992). Los resultados finales fueron empleados para preparar las imágenes de algunas de las estructuras más representativas de KIA7I (Figura 25A). Las conformaciones calculadas parecían divergir significativamente después de varios cientos de ps sugiriendo, tal y como se propuso en vista de los resultados de los experimentos de RMN, que KIA7I era capaz de adoptar un conjunto de conformaciones con una notable diversidad estructural, la cual se hacía evidente sobre todo al observar los extremos C-terminales de los péptidos.

Las  $\alpha$ -hélices de las variantes de KIA7 con residuos aromáticos son rectas o ligeramente curvadas y los residuos C-terminales se encuentran orientados hacia el bolsillo hidrófobo. En el caso del péptido KIA7I, tal y como demostraron los análisis de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  de las estructuras

generadas durante la simulación (Apéndice 5), se observó que los tetrámeros conservarían la estructura helicoidal pero los extremos C-terminales G-G-I carecerían de una conformación única (Figura 25B). Además, estos tetrámeros parecían poseer cierta tendencia a que dos o tres de las hélices presentasen pliegues en los que fallaba el puente de hidrógeno entre un grupo amida y un grupo carbonilo aceptor dentro del enlace peptídico. Estos pliegues reducían el tamaño de los bolsillos hidrófobos en los extremos de las hélices para acomodar la cadena lateral del residuo de Ile, de menor tamaño que los residuos aromáticos. Por lo tanto, queda demostrado que los residuos de Ile del extremo C-terminal presentaban cierta variedad de conformaciones y patrones de unión por puentes de hidrógeno con los residuos adyacentes. En los compuestos KIA7 con F, H, W o Y en la posición 20, esta unión tiene lugar de forma más específica, mientras que para KIA7I el residuo terminal tenía mayor libertad y nos encontramos con que podía adoptar diversas orientaciones, según las interacciones por puente de hidrógeno que se formasen. Un modelo estructural representativo de una de estas conformaciones fue depositado en la PMDB: ID-PM0077491.



**Figura 25.** A) Imagen estereoscópica de un modelo estructural de KIA7I calculado mediante protocolos de dinámica molecular. Se observa que los tetrámeros conservan la estructura helicoidal. El esqueleto peptídico se muestra en blanco, las Ala en naranja, las Lys en azul, las Gly como G y los puntos rojos indican los grupos NH que pierden el enlace de hidrógeno haciendo que las hélices se curven más que en el caso de las variantes de KIA7 con una mayor estabilidad. El resto de puentes de hidrógeno están señalados en marrón. B) Los extremos C-terminales G-G-I carecerían de una conformación predeterminada, de modo que las Ile finales se encontrarían desordenadas y por lo tanto serían incapaces de ocupar correctamente el bolsillo hidrófobo, como ocurre en el caso de los compuestos aromáticos (Diez-García et al. 2011).

## 5.2. Interacción con arenos, predominantemente benceno y fenol

Ha quedado demostrado que KIA7I puede tener la capacidad de originar estructuras tetraméricas helicoidales de manera parcial y sin una conformación predeterminada única. ¿Qué ocurriría entonces si, ante la falta de un residuo C-terminal que definiese una estructura polipeptídica estable y bien diferenciada, péptidos ligeramente desplegados como este interaccionasen con diferentes arenos presentes en el medio? ¿Podría esta interacción servir para desplazar ese equilibrio entre las diversas conformaciones hacia una única estructura específicamente plegada? Estas fueron las preguntas que sugirieron la idea de realizar ensayos de interacción entre KIA7I y diferentes compuestos aromáticos simples (fenol, anilina, anisol, naftaleno, o-xileno, p-xileno, tolueno y benceno), monitorizando el efecto sobre la estructura del péptido mediante espectroscopia de RMN y ensayos de fluorescencia del ANS. A su vez, con el fin de asegurarnos de la generalidad de los hallazgos, realizamos también experimentos similares con péptidos y proteínas de diferente naturaleza estructural y cierta importancia en el ámbito de la biomedicina (KIA7W, CG<sub>3</sub>KIA7, A $\beta$ <sub>1-40</sub> y HEWL).

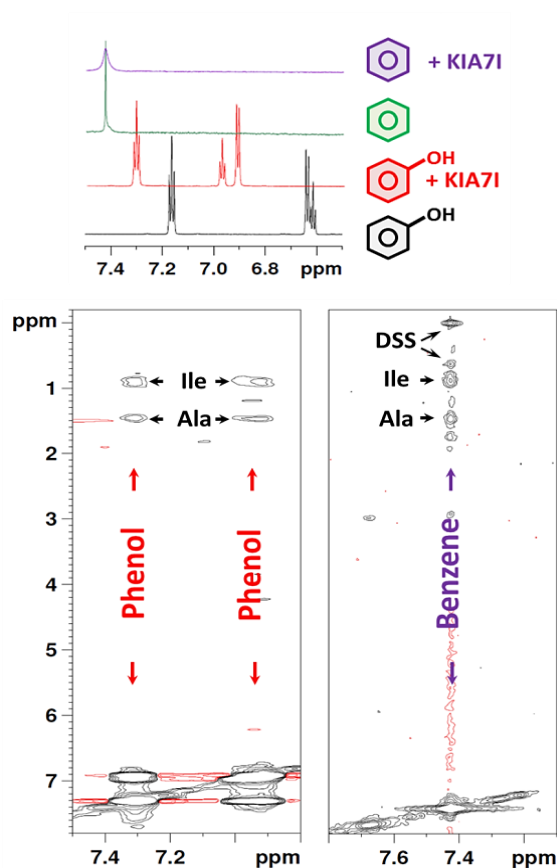
### 5.2.1. Espectroscopia de RMN: NOEs intermoleculares

Dada la baja solubilidad en agua de benceno y tolueno, para el estudio de su interacción con KIA7I mediante RMN se llevó a cabo el procedimiento siguiente: cuidadosamente se depositaba una pequeña gota de 50  $\mu$ L de areno puro sobre una solución 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O con KIA7I 2.5 mM y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,50 M, en tampón D/NaAc a pH 5.0 y 5 °C, con y sin DSS 50  $\mu$ M. Después, se incubaban las muestras preparadas durante 18 h a 4° C y con cuidado se retiraba la gota de areno haciendo uso de una pipeta. El protocolo se optimizó realizando un seguimiento de la concentración de areno disuelto en la muestra con espectros de RMN 1D <sup>1</sup>H para comprobar que durante la incubación transcurriese el tiempo suficiente; parte del areno quedaría disuelto en la fase acuosa y evitaríamos después señales muy grandes a causa de un exceso del mismo, las cuales podrían solaparse con el resto de picos detectados e impedirnos discernir bien entre si las señales eran debidas a la interacción o al areno libre, tal y como se ilustra en el apartado 8.5.

Las muestras se prepararon siguiendo las indicaciones arriba enunciadas, en presencia y en ausencia de arenos, tanto para KIA7I como para los demás péptidos y proteínas puestos a prueba: alguna de las variantes de KIA7 más estables y mejor plegadas, tales como KIA7W (a una concentración de 3 mM) y CG<sub>3</sub>KIA7 (2 mM y en presencia de NaCl 200 mM); el polipéptido del

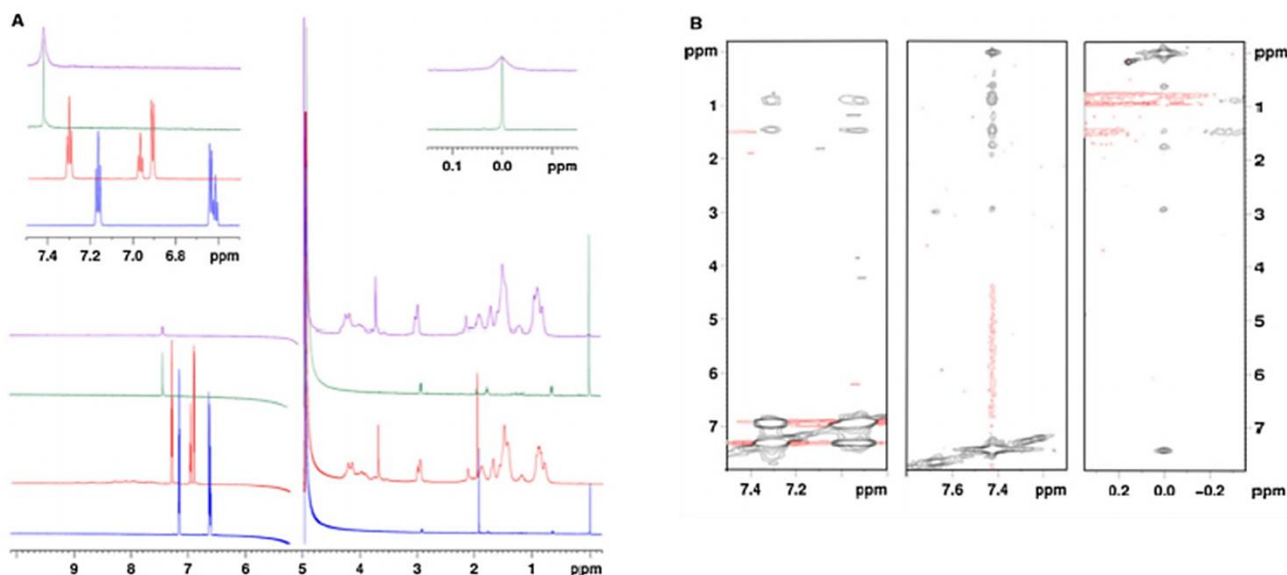
Alzheimer A $\beta_{1-40}$ , rico en residuos hidrófobos y que a pH neutro se encuentra en una forma monomérica intrínsecamente desordenada (0,22 mM, con tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM a pH 7.0 y 25° C); y una proteína bien plegada de estructura conocida, como lo es la HEWL (2,9 mM, a pH 4.0 y 35° C). Para todos ellos se adquirieron espectros 1D <sup>1</sup>H, además de espectros 2D NOESY para A $\beta_{1-40}$  y 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC para el caso de la lisozima. En alguno de estos últimos espectros centramos el pulso de excitación para <sup>13</sup>C a 120 ppm con el fin de observar, además de las señales correspondientes a los picos de correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C de los grupos aromáticos del enzima, así como las señales debidas a los núcleos del benceno.

Los resultados obtenidos mostraron cambios relevantes para las muestras de KIA7I en presencia de benceno y fenol. Aunque el benceno posee un espectro de resonancia con una señal singlete fina, con una anchura de línea característica de 1,9 Hz a 7.42 ppm, en presencia de KIA7I esta señal se ensanchaba sustancialmente (16,0 Hz) y aparecían NOEs con picos que se encontraban a 1.50 y 0.88 ppm (Figura 26). Estos NOEs en los espectros de RMN eran del mismo signo que las señales de KIA7I y se asignaron a Ala H $\beta$ , Ile H $\gamma$  y H $\delta$  y Lys H $\gamma$ , residuos pertenecientes al núcleo hidrófobo de KIA7I, donde parecían estar uniéndose algunas de las moléculas de benceno. No se observaron cambios significativos en los valores de desplazamiento químico para el benceno o KIA7I, por lo que se pudo afirmar que el compuesto aromático no adoptaba una conformación



**Figura 26.** Regiones de los espectros 1D <sup>1</sup>H (encima) y 2D NOESY ( $\tau_m = 80$  ms) de muestras de KIA7I en presencia y ausencia de benceno o fenol (debajo). En los espectros 1D hay que resaltar las diferencias en la anchura e intensidad de los picos del benceno (también experimentadas por las señales correspondientes al DSS) y el cambio de posición de los picos del fenol. En el caso de los espectros 2D, destacan los NOEs formados entre los residuos del bolsillo hidrófobo y los arenos, así como los picos de correlación hallados en las muestras con KIA7I, benceno y DSS (Diez-García et al. 2011).

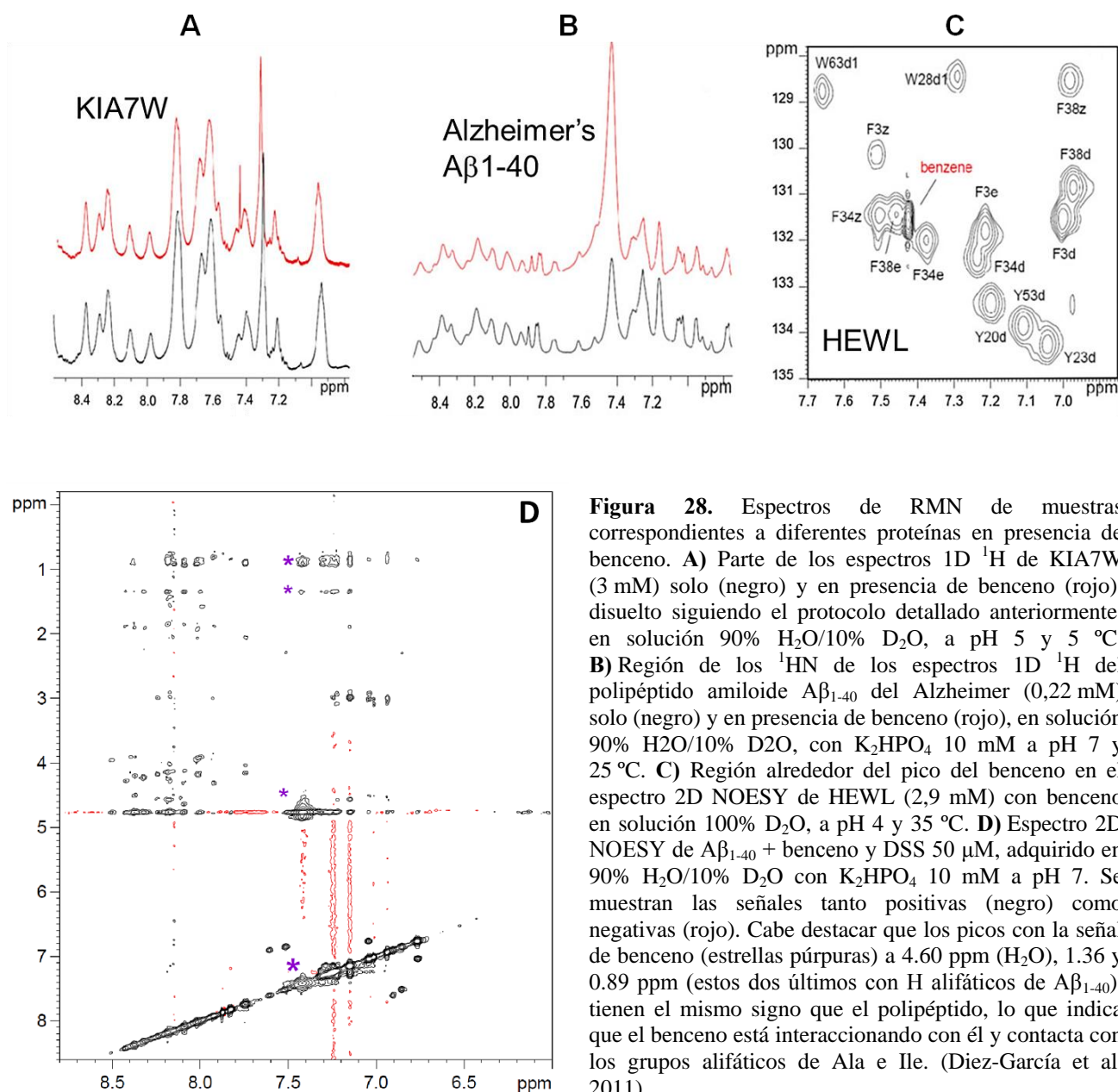
magnética fija o única al unirse a KIA7I y, además, no inducía cambios en la estabilidad en la estructura del tetramero al unirse a la proteína. Los experimentos se llevaron a cabo tanto en presencia como en ausencia de DSS, el compuesto usado como referencia para los desplazamientos químicos, obteniéndose evidencias de interacción similares también con él. Lo más interesante al respecto, y que ocurría únicamente en el caso del benceno, era que las señales del DSS no variaban en presencia de KIA7I, pero sí lo hacían cuando los tres compuestos (DSS, benceno y KIA7I) se encontraban presentes en la muestra (Figura 27). Es entonces cuando las señales del grupo trimetilo del compuesto de referencia se volvían más anchas (1,9-17,5 Hz) y aparecían NOEs entre picos de benceno y el grupo trimetilo del DSS. Todo ello nos aportó claras evidencias para deducir que el DSS por sí solo no se unía a KIA7I, pero sí lo hacía en presencia de benceno. En este sentido, se sabe que el DSS se une a polipéptidos de carga positiva parcialmente estructurados, tales como las fibrillas de amiloide A $\beta$  del Alzheimer (Laurents et al. 2004). También se ha puesto de manifiesto que la unión del DSS tiene lugar de forma característica en proteínas con estado conformacional de glóbulo fundido (Shimizu et al. 1994). Teniendo en cuenta todos estos datos y consideraciones, parece plausible que la unión del benceno favorece de algún modo el desempaquetamiento del núcleo hidrófobo de KIA7I, dándole la libertad suficiente para permitir la unión con el DSS.



**Figura 27. A)** Espectros de RMN de KIA7I en presencia de benceno y fenol, adquiridos con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, en H/NaAc 10 mM, a pH 5 y 5 °C. Espectros 1D <sup>1</sup>H de fenol en azul, KIA7I + fenol en rojo, benceno en verde y KIA7I + benceno en púrpura. En las regiones ampliadas se pueden apreciar los cambios observados en los compuestos aromáticos (izquierda) y en el DSS (derecha). **B)** Regiones del espectro 2D NOESY ( $\tau_m$  = 80 ms) de KIA7I + fenol 1,0 mM (izquierda), KIA7I + benceno en disolución acuosa (centro) y KIA7I + benceno + DSS y 50  $\mu$ M (derecha) (Diez-García et al. 2011).

En cuanto a la interacción del fenol con KIA7I, se obtuvieron evidencias de unión semejantes, tales como cambios en las señales de desplazamiento químico y ensanchamientos en las señales de resonancia del fenol, además de NOEs intermoleculares entre el compuesto aromático y grupos metilo de Ala e Ile de KIA7I (Figura 26). No obstante, solo se observó un NOE débil entre el DSS y KIA7I y no se detectaron NOEs entre el compuesto aromático y el DSS. Esto sugería que la unión del fenol a KIA7I era más débil que en el caso de la unión entre el polipéptido y el benceno, probablemente a causa de su mayor polaridad.

Con el fin de averiguar cómo de generalizada era la unión del benceno a proteínas, se realizaron experimentos de RMN para obtener los espectros correspondientes a otras cuatro proteínas diferentes: KIA7W, CG<sub>3</sub>KIA7, el polipéptido amiloide A $\beta$ <sub>1-40</sub> del Alzheimer y HEWL. En presencia de KIA7W, el benceno aparecía como una señal fina (pico a 7.42 ppm con una anchura a media altura de 2 Hz), reflejando la falta de unión (Figura 28A). En el caso de CG<sub>3</sub>KIA7, se obtenían resultados similares, pero en presencia de A $\beta$ <sub>1-40</sub> el pico sufría un ensanchamiento considerable (33 Hz) (Figura 28B). La unión del benceno a A $\beta$ <sub>1-40</sub> se corroboró al detectar NOEs entre el areno y el polipéptido en los espectros 2D NOESY (Figura 28C). En cuanto a los resultados en presencia de HEWL, el singlete del benceno se solapaba con resonancias de la proteína en los espectros de RMN 1D <sup>1</sup>H y 2D homonucleares, pero se resolvía como un pico fino en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Figura 28C) y los residuos aromáticos de la proteína poseían los mismos valores de desplazamiento químico que se obtuvieron en ausencia de benceno (Wang et al. 2000). Basándonos en estos resultados, pudimos concluir que el benceno se unía principalmente al polipéptido de estructura desordenada A $\beta$ <sub>1-40</sub>, pero no a las proteínas bien plegadas KIA7W, CG<sub>3</sub>KIA7 y HEWL.



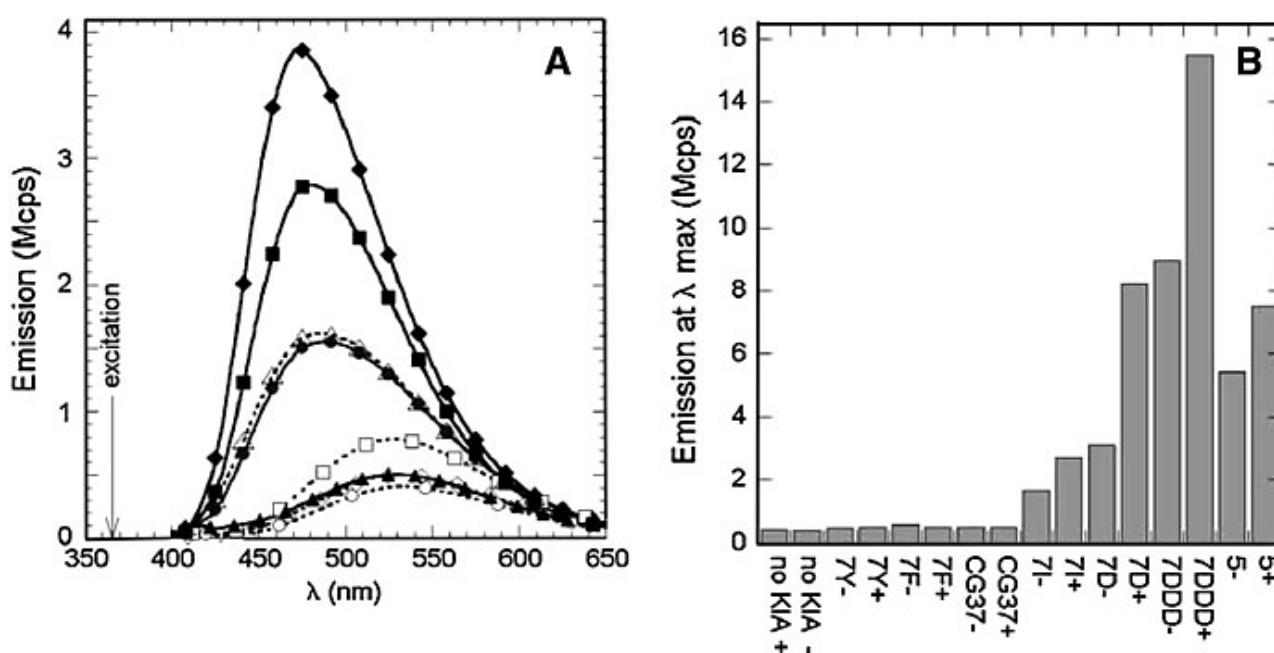
**Figura 28.** Espectros de RMN de muestras correspondientes a diferentes proteínas en presencia de benceno. **A)** Parte de los espectros 1D  $^1\text{H}$  de KIA7W (3 mM) solo (negro) y en presencia de benceno (rojo), disuelto siguiendo el protocolo detallado anteriormente, en solución 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ , a pH 5 y 5 °C. **B)** Región de los  $^1\text{HN}$  de los espectros 1D  $^1\text{H}$  del polipéptido amiloide  $\text{A}\beta_{1-40}$  del Alzheimer (0,22 mM) solo (negro) y en presencia de benceno (rojo), en solución 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$ , con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM a pH 7 y 25 °C. **C)** Región alrededor del pico del benceno en el espectro 2D NOESY de HEWL (2,9 mM) con benceno en solución 100%  $\text{D}_2\text{O}$ , a pH 4 y 35 °C. **D)** Espectro 2D NOESY de  $\text{A}\beta_{1-40}$  + benceno y DSS 50  $\mu\text{M}$ , adquirido en 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$  con  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM a pH 7. Se muestran las señales tanto positivas (negro) como negativas (rojo). Cabe destacar que los picos con la señal de benceno (estrellas púrpuras) a 4.60 ppm ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 1.36 y 0.89 ppm (estos dos últimos con H alifáticos de  $\text{A}\beta_{1-40}$ ), tienen el mismo signo que el polipéptido, lo que indica que el benceno está interaccionando con él y contacta con los grupos alifáticos de Ala e Ile. (Diez-García et al. 2011).

### 5.2.2. Fluorescencia del ANS: conformaciones parcialmente desplegadas

En vista de las conclusiones extraídas de los experimentos de RMN, que parecían mostrar indicios de que el benceno se unía a péptidos parcialmente desplegados o de estructura predominantemente desordenada, decidimos llevar a cabo ensayos de fluorescencia en presencia de ANS. Los detalles acerca de este tipo de fluoróforos extrínsecos podemos encontrarlos en el apartado 8.4.2. Basándonos en las características de dicho compuesto, se empleó ANS en buffer Tris 10 mM a



pH 7.0 para estudiar KIA7I y otras variantes con empaquetamientos con una estabilidad mayor (KIA7Y, KIA7F y CG<sub>3</sub>KIA7) o menor (KIA7Δ, KIA7ΔΔΔ y KIA5). El ANS por sí solo, disuelto en buffer, posee una baja emisión de fluorescencia cuya máxima longitud de onda ( $\lambda_{Em\ max}$ ) es de 534 nm, la cual no se veía afectada por la adición de benceno o fenol. En presencia de KIA7I, la intensidad de emisión del ANS incrementaba tres o cuatro veces su valor y la  $\lambda_{Em\ max}$  disminuía hasta los 490 nm aproximadamente (Figura 29A). Según esto, el ANS se uniría a KIA7I y el entorno de unión del ANS se haría menos polar, probablemente al interaccionar el ANS con las regiones no polares de los extremos en los pares de KIA7I, los cuales están ocupados por residuos aromáticos en otras variantes de KIA7. En presencia de ambos, benceno y KIA7I, el ANS mostró una desviación hacia el azul significativa y un incremento en la intensidad de emisión. Esto sugería que el benceno era capaz de intercalarse en el bolsillo hidrófobo de KIA7I y “aflojar” su empaquetamiento de forma que los grupos no polares quedaban más expuestos para la interacción con el ANS.

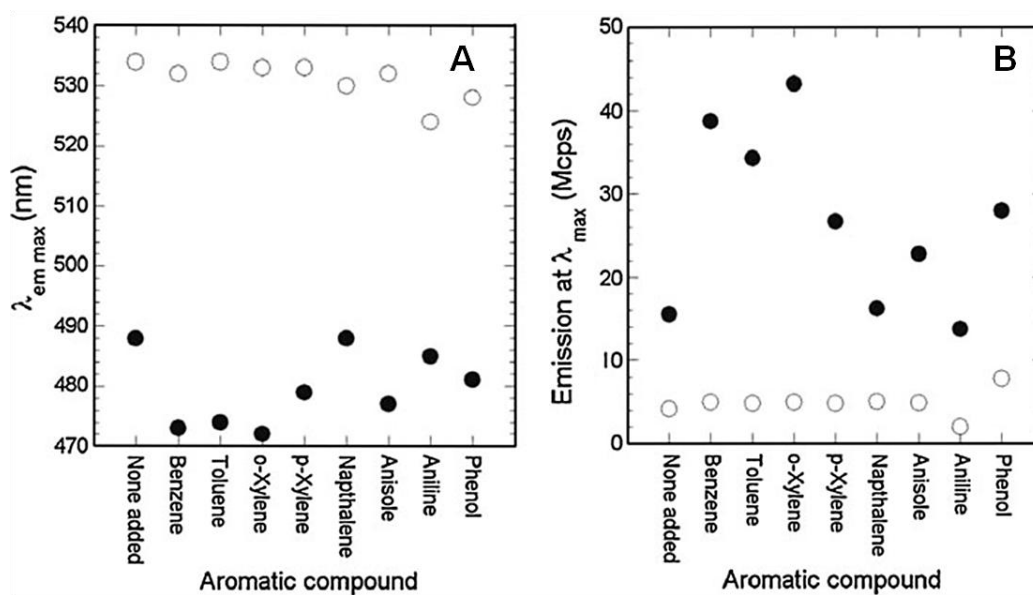


**Figura 29.** Resultados de los experimentos de fluorescencia con los diferentes péptidos (120-200  $\mu$ M), en presencia de ANS (120  $\mu$ M), con tampón Tris 10 mM pH 7. Se usó un espectrómetro Jobin Yvon Fluoromax 4 equipado con un control de temperatura mediante un dispositivo Peltier y empleando una cubeta Hellma QS de 3x3 (volumen de 0,10 mL). Se usó una  $\lambda_{Ex} = 365$  nm y los espectros de emisión fueron recogidos en un rango de  $\lambda$  desde 400 a 650 nm, tomando medidas cada 1 nm. El tiempo de integración fue de 0,5 s/nm y la apertura de las rendijas, tanto de salida como de entrada, fueron fijadas a 3 nm. La concentración del ANS se determinó mediante absorbancia, usando un  $\epsilon_{350nm} = 5000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Weber and Young 1964). Las muestras se prepararon por triplicado y después se promediaron los resultados finales. **A)** Gráfico de la emisión de fluorescencia registrada a 25 °C, en millones de fotones (“counts”) por segundo, respecto a las diferentes longitudes de onda monitorizadas durante el escaneo de las muestras: ANS (○), ANS + KIA7I (●), ANS + benceno (◇), ANS + benceno + KIA7I (◆), ANS + fenol (□), ANS + fenol + KIA7I (■), ANS + naftaleno (▲) y ANS + naftaleno + KIA7I (Δ). **B)** Histograma de la emisión del ANS en las muestras con los diferentes péptidos, en presencia (+) o ausencia (-) de benceno, a 2 °C (Diez-García et al. 2011).



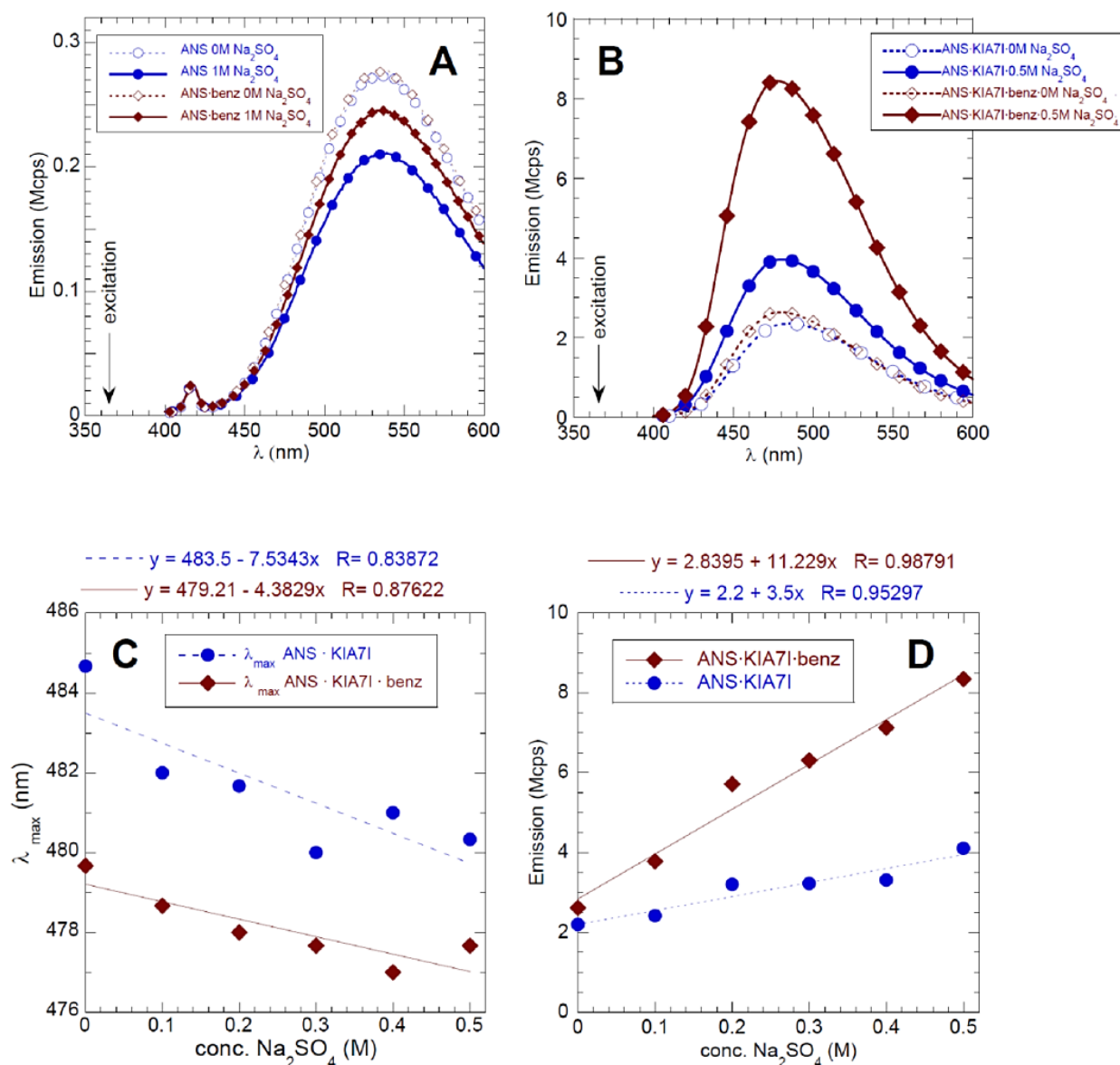
En los estudios anteriores ya se había demostrado que mientras la variante específicamente plegada KIA7Y adopta una conformación “four helix bundle” bastante estable y no da lugar a un significativo aumento en la fluorescencia del ANS, KIA5, una variante desordenada de esta (posee la misma composición aminoacídica, pero con la posición de algunos de los residuos de Ala e Ile intercambiados entre sí), da lugar a un fuerte aumento en la fluorescencia del ANS e induce una considerable disminución de la  $\lambda_{Em\ max}$  (Boon et al. 2004). En este trabajo, hemos podido comprobar por vez primera el efecto de estas variantes de KIA sobre la emisión de fluorescencia del ANS, tanto en presencia como en ausencia de benceno. Esencialmente, no se observaron cambios en la fluorescencia del ANS para las variantes de KIA más estables y plegadas de forma específica (KIA7Y, KIAF y CG<sub>3</sub>KIA7), con o sin benceno. Por el contrario, las variantes peor estructuradas o desplegadas (KIA7 $\Delta$ , KIA7 $\Delta\Delta\Delta$  y KIA5) inducían un aumento significativo en la fluorescencia del ANS, efecto que se veía incrementado en presencia de benceno (Figura 29B). El efecto observado en la fluorescencia del ANS para KIA7I, en estas mismas condiciones, se encontraría en un nivel intermedio al de estos dos casos. Estos resultados nos permitieron sugerir que la capacidad del benceno para contribuir en la formación de estructuras hidrófobas empaquetadas más holgadamente, depende del grado de estructuración de las proteínas, siendo esta capacidad mayor para las proteínas menos estructuradas.

Por ello, para apoyar esta idea, se determinó además la influencia que tienen otros compuestos aromáticos sobre la fluorescencia del ANS. Para la preparación de las muestras se colocó una gota de 10  $\mu$ L del compuesto aromático (benceno, tolueno, o- o p-xileno, anisol o anilina), un grano de fenol o un poco de naftaleno sobre una fase acuosa sin mezclarlos. Las muestras se incubaron en hielo durante 18 horas y después fueron colocadas en la cubeta al menos tres minutos antes de realizar las medidas. Como resultado, encontramos que mientras los compuestos aromáticos tenían efectos nulos o moderados en la  $\lambda_{Em\ max}$  del ANS en ausencia de KIA7I, benceno, tolueno y o-xileno, en presencia del péptido, incrementaban la desviación de la emisión del ANS hacia el azul y daban lugar a los mayores incrementos en la intensidad de la fluorescencia emitida. p-xileno, naftaleno, anisol, anilina y fenol, por el contrario, tenían efectos más débiles sobre la fluorescencia emitida por el ANS (Figura 30) cuando estaban acompañados de KIA7I. Basándonos en estos resultados propusimos que benceno, tolueno y o-xileno, los arenos más apolares y de menor tamaño puestos a prueba, no quedarían confinados en el bolsillo hidrófobo pero sí penetrarían en él y “aflojarían” la conformación estructural de la proteína para permitir un plegamiento más favorable y la unión al ANS (Diez-García et al. 2011).



**Figura 30.** Diagramas de emisión de fluorescencia del ANS de KIA7I con diferentes compuestos aromáticos. Las medidas se tomaron en muestras con Tris buffer 10 mM a pH 7 y 25 o 2 °C, a una concentración del péptido de 120-200  $\mu$ M y del ANS de 120  $\mu$ M. **A)**  $\lambda_{Em\ max}$  del ANS para distintos arenos en presencia (●) o ausencia (○) de KIA7I. **B)** Intensidad de la fluorescencia del ANS a la  $\lambda_{Em\ max}$  para esos mismos compuestos en presencia (●) o ausencia (○) de KIA7I.

Con la intención de conocer más a fondo el tipo de interacciones que mediaban en la interacción entre péptido, areno y ANS, estos mismos experimentos de fluorescencia se llevaron a cabo en soluciones acuosas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,5 - 1,0 M), en tampón H/NaAc 10 mM a pH 5.0 y 5° C. En ausencia de KIA7I y en presencia o ausencia de benceno, incrementando las concentraciones de sal, se producía una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS al incrementar la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sin detectarse cambios en la posición del máximo. En presencia de KIA7I, la intensidad de la emisión de fluorescencia del ANS aumentaba y sufría una desviación hacia longitudes de onda menores, cambios que se veían acrecentados en presencia de benceno (Figura 31). Estos descubrimientos corroboraron la unión de KIA7I y benceno observada por RMN en estas mismas condiciones y por fluorescencia del ANS a pH 7.0 en buffer Tris 10 mM sin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Además, el incremento de la intensidad de emisión del ANS y la desviación hacia longitudes de onda menores, en presencia de KIA7I, era observable a concentraciones mayores de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y estos cambios son aún más significativos al añadir benceno. Es por ello que, como el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  aumenta la fuerza de las interacciones hidrófobas debido al efecto Hofmeister, estos resultados podrían atribuirse a la presencia de asociaciones más fuertes entre ANS, benceno y las fracciones no polares de KIA7I.



**Figura 31.** Gráficos de fluorescencia del ANS de muestras de KIA7I en tampón H/NaAc 10 mM pH 5 a varias concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 5 °C, realizando barridos desde 400 a 600 nm. **A)** Espectro de emisión de fluorescencia del ANS, con y sin sal, y en presencia y ausencia de benceno. **B)** Espectros similares a los de A pero con KIA7I. **C)**  $\lambda_{\text{Em max}}$  e **D)** intensidad de la fluorescencia del ANS de muestras de KIA7I en presencia (rojo) o ausencia (azul) de benceno a distintas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

**6.     *KiAβ***



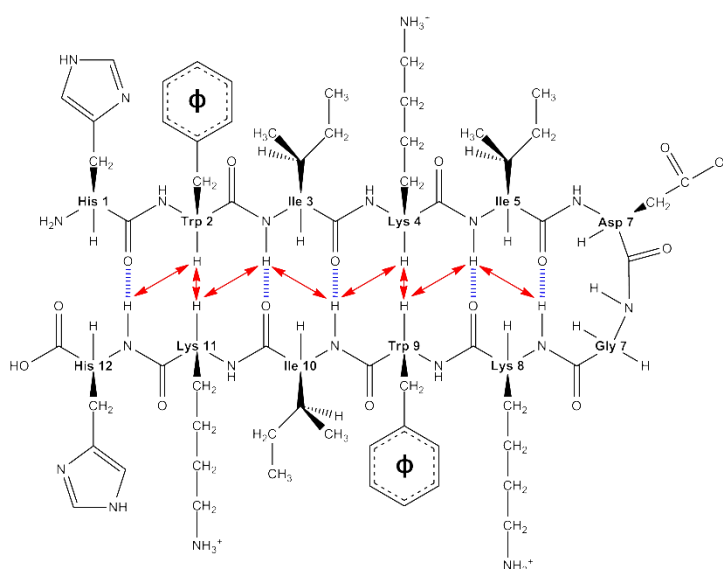
Con los estudios de los péptidos helicoidales descritos en los apartados anteriores ha quedado demostrado que pequeños péptidos formados por 20 residuos, compuestos únicamente por aminoácidos putativamente prebióticos, son capaces de formar estructuras terciarias y cuaternarias específicamente plegadas y establecer relaciones de interacción de forma selectiva con RNAs estructurados de forma específica. La incógnita que surge ahora es si estamos ante la mínima expresión de lo que podrían llegar a ser los compuestos formados en condiciones abióticas con los que los ácidos nucleicos pudiesen haber compartido un supuesto “RNA-peptide World”. En este sentido, hasta ahora nos habíamos centrado en el estudio de péptidos capaces de adoptar conformaciones en hélice  $\alpha$ , una de las estructuras secundarias más estudiadas, dadas las propiedades de las interacciones locales que otorgan gran estabilidad a las formas plegadas específicamente (Chakrabartty and Baldwin 1995) de los compuestos aminoacídicos.

Con la idea de hallar péptidos con propiedades similares, pero de complejidad más reducida, dirigimos nuestro interés al estudio de estructuras en horquilla  $\beta$ , como otro de los tipos de plegamiento que podrían haber surgido en un mundo prebiótico con facilidad (Brack and Orgel 1975; Lewandowska et al. 2010). A diferencia de las hélices  $\alpha$ , la formación de este tipo de estructuras a partir de secuencias polipeptídicas cortas sería perfectamente viable en condiciones prebióticas; además, poseen capacidades de autoensamblaje, uno de los requisitos que deberían de cumplir las moléculas prebióticas en los inicios de la abiogénesis (Bourbo et al. 2011). En base a esto y teniendo en cuenta que cadenas de menor longitud pueden dar lugar a estructuras de este tipo, ¿por qué no contemplar también la posibilidad de la existencia de péptidos con una conformación de horquilla  $\beta$  en este mundo primigenio? Por ello, realizamos un cambio de perspectiva desde el punto de vista de estos péptidos prebióticos y se diseñó una serie de compuestos denominados KIA $\beta$ , presuntamente capaces de adoptar una estructura de horquilla  $\beta$  antiparalela, formada por 12 residuos ordenados según la siguiente secuencia de aminoácidos: H $\phi$ IKIDGK $\phi$ IKH, siendo  $\phi$  el mismo residuo aromático (His, Phe o Trp), lo que aportaría estabilidad a la estructura al generarse interacciones con las cadenas laterales de residuos adyacentes, al mismo tiempo que permitirían la aparición de fenómenos de apilamiento entre los anillos aromáticos enfrentados en la diagonal (de Alba et al. 1999; Wu et al. 2010), tal y como se explica con más detalle a continuación.

## 6.1. Diseño estructural y funcional

La composición aminoacídica de los péptidos KIAβ se diseñó “de novo” a partir de resultados y datos recogidos en los numerosos estudios realizados dentro de nuestro grupo de investigación, siguiendo un algoritmo similar para su creación (de Alba et al. 1997; de Alba et al. 1999; Pantoja-Uceda et al. 2006; Santiveri et al. 2011). Los péptidos KIAβ están formados por aminoácidos en su mayoría prebióticos y poseen His en sus extremos N y C terminales, algo que junto con el establecimiento de interacciones con el par  $\phi\phi$  podría favorecer el plegamiento estable de la molécula (Figura 32). Las interacciones hidrófobas, los puentes de hidrógeno, las asociaciones de tipo catión- $\pi$  o incluso quizás las interacciones por apilamiento, serían las fuerzas principales que definirían la estabilidad de este tipo de horquillas  $\beta$ . Gracias a los numerosos grupos hidrófobos y cargas expuestos en su superficie, se esperaría también que fuesen capaces de unirse a ácidos nucleicos y nucleótidos, tales como el ATP.

Para ocupar las posiciones correspondientes a los residuos del par  $\phi\phi$  se escogieron compuestos aromáticos que según sus propiedades podrían adaptarse mejor a una conformación de este tipo, sin afectar demasiado a la estabilidad de las estructuras. En este sentido, se escogió diseñar péptidos con pares formados por His, Phe o Trp. Las His, los residuos aromáticos más polares y versátiles, son capaces de formar diversos tipos de interacciones, poseen formas cargadas, tienen sustituyentes capaces de actuar como donadores y aceptores en puentes de hidrógeno y no son muy hidrófobos. Además, es el aminoácido aromático que se ha encontrado en mayor proporción durante los experimentos en distintas condiciones putativamente prebióticas descritos en el capítulo 1. Phe, más hidrófobo que His, requeriría de condiciones abióticas más complejas, no podría participar en puentes de hidrógeno, pero sí sería capaz de formar parte de interacciones catión- $\pi$ . En el caso del



**Figura 32.** Representación esquemática de la secuencia de KIAβ. En la figura podemos observar tanto los puentes de hidrógeno formados entre los sustituyentes C=O y N-H de los grupos amida que componen el esqueleto peptídico de la molécula (en azul), como las interacciones generadas entre los átomos  $^1$  y  $H\alpha$  de residuos adyacentes (flechas rojas). Estas últimas darán lugar, en los espectros de RMN adquiridos, a NOEs característicos de la estructuración de los péptidos siguiendo esta conformación de horquilla  $\beta$  con las hebras situadas de forma antiparalela. En conjunto, todos estos fenómenos de interacción por puentes de hidrógeno, sumados a la influencia de las interacciones por apilamiento y los enlaces catión- $\pi$  alrededor de los aminoácidos aromáticos, deberían de aportar una mayor estabilidad a los péptidos KIAβ.

Trp, aunque aún no se ha descubierto una ruta de síntesis prebiótica plausible para el mismo, es el de mayor tamaño e hidrofobicidad, puede formar interacciones  $\pi$ - $\pi$  por apilamiento e interacciones de tipo catión- $\pi$  mucho más estables que His o Phe, además de ser capaz de formar un puente de hidrógeno.

En lo concerniente a la longitud de las hebras que forman parte de cada horquilla, en estudios anteriores se demostró que existe una limitación en la longitud de las mismas (Santiveri and Jimenez 2010). Horquillas  $\beta$  con hasta 5 aminoácidos por hebra, como es el caso del péptido estudiado, son capaces de adoptar estructuras cuya estabilidad aumenta al crecer su longitud. No obstante, este aumento de la estabilidad es causado probablemente por un cambio en la conformación de las hebras que, a medida que ven incrementada su longitud, presentan un predominio mayor hacia la formación de hélices  $\alpha$  (Stanger et al. 2001). Por tanto, parece que la opción de 5 residuos por hebra elegida para el péptido KIA $\beta$  era muy apropiada para asegurar que nuestro estudio se centrara en una conformación de tipo horquilla  $\beta$ . La disposición de Gly en posiciones intermedias de la molécula es otro de los factores que evitaría el predominio de plegamientos que adoptasen una conformación en hélice  $\alpha$ , al igual que ocurre con la presencia de aminoácidos voluminosos y con cadenas laterales ramificadas (Chakrabartty et al. 1991).

Las interacciones entre los residuos que forman parte del giro existente entre las dos hebras parecen tener un importante papel en la estabilidad y el plegamiento de péptido. Asn sería el aminoácido ideal para ocupar alguna de las posiciones en el giro pero, a diferencia de Asp, hasta la fecha no se ha sintetizado en condiciones prebióticas (Zaia et al. 2008). Por ello, para ocupar dicha posición se eligieron Asp y Gly teniendo en cuenta sobre todo que la cadena lateral de los residuos junto a la Gly sirven para que se establezcan las interacciones necesarias con los aminoácidos adyacentes, que será lo que defina los ángulos de la zona de giro en las horquillas (de Alba et al. 1997; Griffiths-Jones et al. 1999) y, por ende, afecte a la disposición de las hebras en el espacio.

Otro de los factores que podrían influir sobre los péptidos KIA $\beta$  a la hora de formar la estructura de horquilla serían las His terminales. Si bien los extremos no se encontraban modificados, en detrimento de la estabilidad de la molécula (Kier et al. 2010), el hecho de que estuviesen ocupados por estos residuos dotados un grupo imidazol, capaz de encontrarse cargado, podría favorecer la formación de estructuras más estables; ello influiría sobre las interacciones electrostáticas de los residuos de las hebras y afectaría también a la conformación espacial de la horquilla (Eidenschink et al. 2009). El carácter anfipático de las hebras también otorgaría cierta estabilidad a la molécula y favorecería la formación de la horquilla. No obstante, hubo que tener en cuenta que las propiedades de las His cambian dependiendo del pH del medio, poseyendo un carácter catiónico a pHs bajos y siendo capaces de actuar, en su forma neutra, como donadores y aceptores en



puentes de hidrógeno y como aceptores en interacciones de tipo  $\pi$ . Al situar las His en los extremos podrían establecerse mayor número de interacciones con los residuos cercanos, en concreto con los grupos aromáticos de las cadenas laterales de los residuos de His, Phe o Trp según las diferentes especies analizadas (KIA $\beta$ H, KIA $\beta$ F y KIA $\beta$ W, respectivamente). Esta versatilidad estructural podría haber supuesto una gran ventaja para los péptidos prebióticos.

Dentro del diseño estructural ideado, estos residuos aromáticos se dispusieron de forma que diesen lugar a un “microdominio” dentro del péptido que favorecería la interacción entre los residuos a través de interacciones hidrófobas, de tipo  $\pi$ - $\pi$  y/o catión- $\pi$ . Además, dichos aminoácidos se encontraban flanqueados por residuos de Ile, muy buenos candidatos para entrar a formar parte de las estructuras laminares al tratarse de residuos ramificados en  $\beta$ . Podrían establecerse interacciones por puente de hidrógeno con los grupos peptídicos que forman parte del esqueleto de las horquillas  $\beta$ , así como interacciones catión- $\pi$  entre los anillos de Trp y los grupos de las cadenas laterales de residuos próximos (Tatko and Waters 2004; Feverati et al. 2012), al contrario de lo que sucede en las estructuras con conformación en hélice (Slutsky and Marsh 2004).

De este modo, gracias a estos residuos hidrófobos, a los anillos aromáticos más expuestos y a las cargas positivas existentes, los péptidos KIA $\beta$  podrían ser capaces de unirse a ribonucleótidos trifosfato, tal y como detallaremos después. Se han diseñado péptidos y se conoce la existencia de proteínas que poseen láminas  $\beta$  en sus superficies para favorecer su función de interacción con nucleótidos y cadenas de ácidos nucleicos. Esta capacidad de interacción, junto a la sencillez de su estructura y la posibilidad de adoptar estructuras secundarias estables, los capacitaría para haber formado parte del mundo prebiótico junto a los RNAs, pudiendo desempeñar diferentes funciones, siendo capaces de servir como cofactores o agentes protectores frente a factores degradantes (Subramanya et al. 1996; Butterfield et al. 2005; Stewart and Waters 2009).

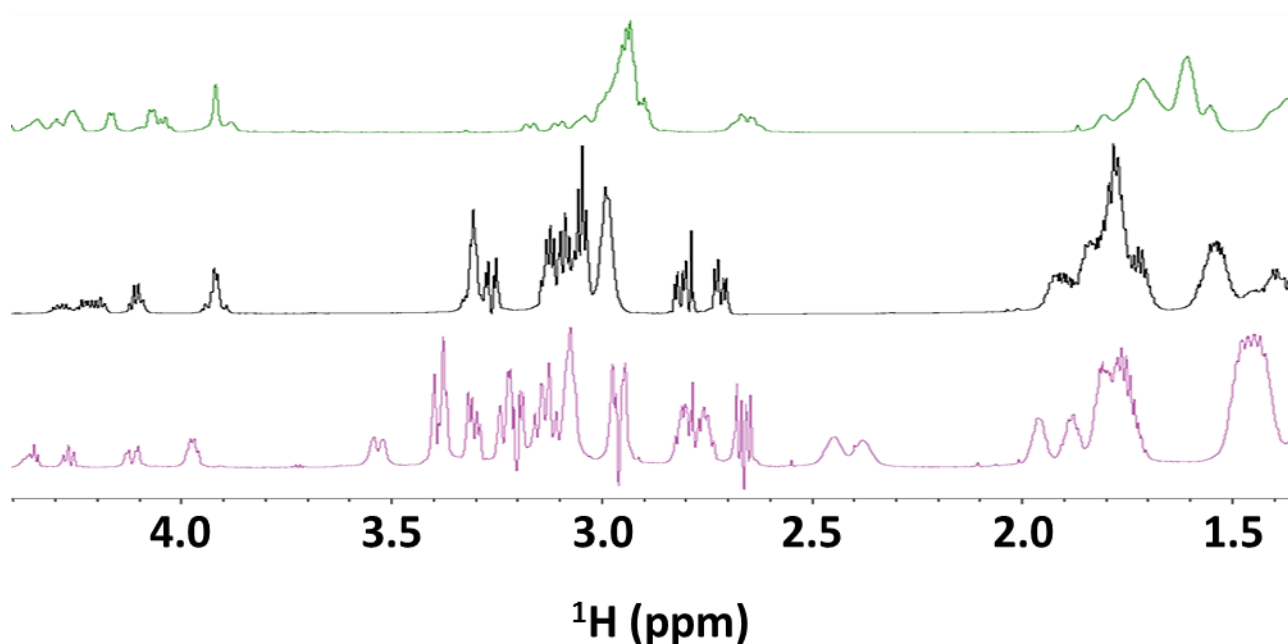
## 6.2. Determinación estructural: horquilla $\beta$ con giro de tipo I'

Gracias a técnicas de CD y espectroscopia de RMN, pudimos elucidar la estructura y estabilidad de los diferentes péptidos KIA $\beta$  analizados. KIA $\beta$ W presentaba espectros de CD y RMN propios de una estructura de horquilla  $\beta$  con las hebras situadas de forma antiparalela, a excepción de los residuos Gly 7 y Asp 8, diseñados para formar parte del giro. En lo concerniente a los péptidos con pares HH y FF, a pesar de tratarse también de residuos aromáticos que bien podrían dar lugar a

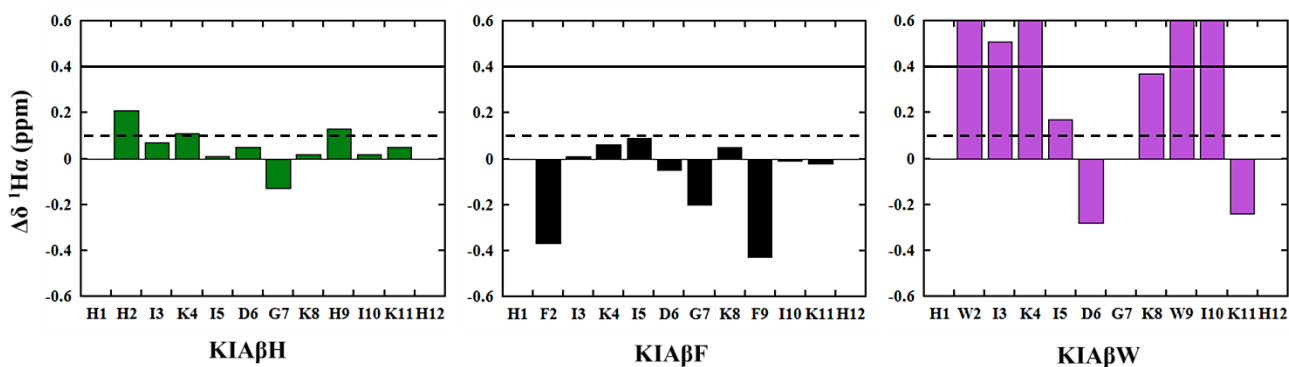
interacciones de tipo catión- $\pi$  o apilamientos entre sí, no se encontraron pruebas para afirmar que son capaces de dar lugar a una estructura única, estable y específicamente plegada con una conformación preferente. Parece que el tamaño del aminoácido aromático influía directamente a la hora del establecimiento de estas interacciones por apilamiento en los pares  $\phi\phi$ . His y Phe, con una cadena lateral menos voluminosa que el Trp, no eran capaces de dar lugar a ese apilamiento con el residuo situado en diagonal y las moléculas no llegaban a alcanzar la estructuración y el plegamiento que se encontraban favorecidos en KIA $\beta$ W, la variante con Trp, cuyo microdominio WW recuerda a las cremalleras de triptófano (Cochran et al. 2001). Por lo tanto, este péptido de secuencia HWIKIDGKWIKH, es en el que centramos la mayoría de nuestros estudios.

### 6.2.1. RMN 1D: formas plegada y desplegada de los péptidos KIA $\beta$

Para realizar los experimentos de espectroscopia de RMN se emplearon los mismos equipos Bruker usados en los ensayos con los péptidos helicoidales presuntamente prebióticos y haciendo uso de las mismas premisas a la hora de la adquisición y asignación de los espectros (Wüthrich 1986; Markley et al. 1998). Inicialmente se llevaron a cabo experimentos 1D  $^1\text{H}$  en abundancia natural, pudiéndose observar la diferencia entre los picos bien resueltos y poco solapados de KIA $\beta$ W y los picos solapados que se podían apreciar en el caso de las variantes con His y Phe (Figura 33). Los desplazamientos químicos en el caso de KIA $\beta$ H y KIA $\beta$ F presentaban solo una ligera desviación con respecto a los detectados para pequeños péptidos desestructurados, mientras que los  $\delta$  de los residuos de KIA $\beta$ W, a excepción principalmente de los dos residuos que forman el giro, eran los propios de una estructura en lámina  $\beta$  (Figura 34). En este último caso, el patrón de desplazamientos químicos observado para los residuos de Asp y Gly del giro se correspondía con el mostrado por giros de tipo I' en esta clase de conformaciones (Shen and Bax 2012).



**Figura 33.** Región de los espectros 1D de RMN de KIAβH (arriba, en verde), KIAβF (centro, en negro) y KIAβW (abajo, en morado), a una concentración de péptido aproximada de 3 mM, en tampón H/NaAc 10 mM, a pH 5, 5 °C y con DSS 50 μM, adquiridos gracias al software TopSpin. Es evidente la diferencia en la dispersión de las señales para una y otra variante del péptido, especialmente en el caso de KIAβW.

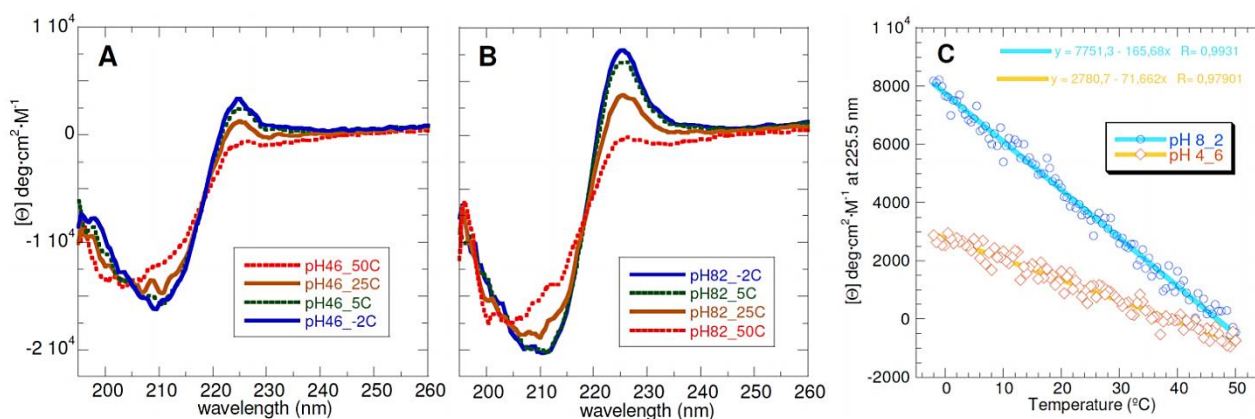


**Figura 34.** Análisis conformacional de desplazamientos químicos en el que se comparan las diferencias entre los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}\alpha$  entre KIAβH (izquierda, en verde, a pH 5), KIAβF (centro, en negro, a pH 5) y KIAβW (derecha, en morado, a pH 6.4) con una conformación de ovillo estadístico para cada uno de los aminoácidos que componen la secuencia de los péptidos (Williamson 1990; Wishart et al. 1991). Las líneas discontinuas horizontales indican que se han alcanzado los valores típicos de una población compuesta al 100% por estructuras de láminas β y las líneas continuas delimitan las diferencias de  $\delta$  para las que se puede afirmar plenamente que los residuos en la población total de péptido detectada poseen una conformación de lámina β.

### 6.2.2. CD: apilamiento del par WW y diferencias de plegamiento según pH y T

Los espectros de dicroísmo circular llevados a cabo nos permitieron comprobar que la interacción entre Trp 2 y Trp 9 tenía lugar mediante fenómenos de apilamiento, descartando un acercamiento de tipo “cara contra borde” entre las cadenas laterales de los residuos (Andersen et al. 2006). A diferencia de este último caso, donde el valor mínimo detectado para la elipticidad molar a 210 nm debería de poseer un valor absoluto similar al del valor máximo observado a 225.5 nm, el valor absoluto de  $\Theta_{225.5\text{nm}}$  era, al menos, la mitad del detectado a 210 nm (Figura 35A y B). Dicho valor de elipticidad a 225,5 nm correspondía a la interacción por apilamiento que se establece entre los residuos de Trp.

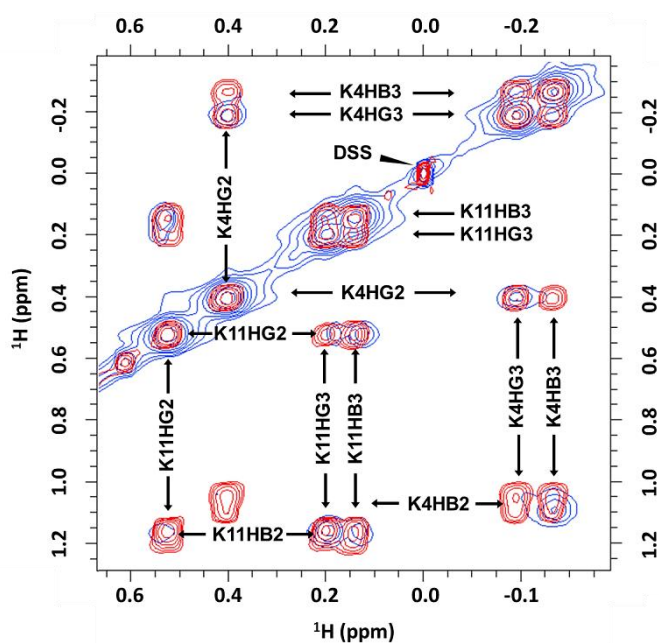
Adicionalmente, se corroboró también la mayor proporción de conformaciones del péptido específicamente plegadas dependiendo del pH y la temperatura a la que se encontrasen las muestras, de forma que, a menor temperatura y a un pH suficiente para que las cadenas laterales de las His estuviesen en su forma neutra, el valor de  $\Theta_{225.5\text{nm}}$  aumentaba, es decir, existía un mayor plegamiento. Por contra, parece que el péptido KIAβW poseía una baja  $T_m$  (Figura 35C), algo que se explicaría más tarde gracias a los datos obtenidos por RMN, en los que no se apreciaba una población de péptido formada exclusivamente por una conformación completamente organizada del mismo. Esto daba a entender que el plegamiento tenía lugar de forma rápida. No se pudo calcular una temperatura de fusión de forma clara ya que la transición entre las formas plegada y desplegada ocurría de forma demasiado gradual, lo cual es un rasgo característico de los péptidos cuya estructura no se encuentra plenamente plegada. Además, también habría que tener en cuenta la contribución del giro  $\beta$  de tipo I', obteniéndose una mezcla de señales (Hutchinson and Thornton 1994).



**Figura 35.** Espectros de CD de muestras de KIAβW analizados usando un espectropolarímetro JASCO J-810, cubetas con un paso óptico de 0,1 cm, a una concentración del péptido de 110  $\mu\text{M}$  y **A)** pH 4.6 o **B)** pH 8.2, a diferentes temperaturas (-2, 5, 25 y 50 °C). Los espectros se adquirieron empleando un promedio de 6 barridos, una velocidad de escaneo de 50 nm/min y un ancho de banda de 1,2 nm. **C)** Gráfico de  $\Theta_{225.5\text{nm}}$  a valores crecientes de temperatura (2 °C por minuto), tanto a pH 4.6, como a pH 8.2.

### 6.2.3. Determinación estructural de KIAβW mediante RMN

Empleando los mismos equipos y razonamientos usados durante la adquisición de los experimentos de RMN iniciales, se llevaron a cabo también experimentos de RMN 1D  $^1\text{H}$ , 2D TOCSY, 2D COSY, 2D NOESY y 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC en abundancia natural, con el fin de elucidar la disposición de los diferentes residuos en los péptidos KIAβ, conocer la estructura de los mismos y obtener modelos moleculares a partir de los desplazamientos químicos y NOEs asignados. Un hallazgo interesante fue el encontrar que resonancias correspondientes a los átomos  $^1\text{H}\beta 3$  (-0.11 ppm) y  $^1\text{H}\gamma 3$  (-0.06 ppm) de Lys 4 se encontraban tan apantalladas que estaban desplazadas más allá del pico de DSS tomado como referencia. También existía una gran desviación en el caso de las señales de uno de los átomos  $^1\text{H}\beta$  (0.49 ppm) y los  $^1\text{H}\gamma$  (0.77 y 0.52 ppm) de Lys 11, lo que significaba que ambos residuos se encontraban próximos a los anillos aromáticos de los residuos de Trp y se veían influenciados por el efecto de apantallamiento de la nube electrónica que los rodeaba (Figura 36).

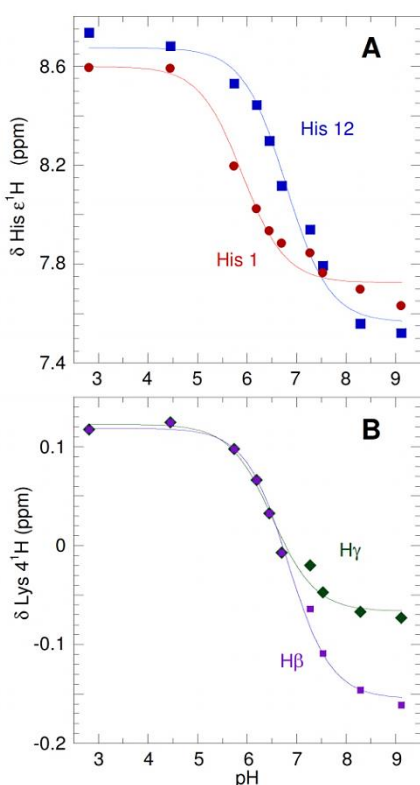


**Figura 36.** Región próxima a la señal detectada a causa del DSS en los espectros 2D NOESY (rojo) y TOCSY (azul) de KIAβW, donde pueden observarse algunas de las señales de las Lys sometidas a un fuerte apantallamiento. Los experimentos de RMN se llevaron a cabo a una concentración de péptido de 6 mM, con tampón H/NaAc 10 mM, a pH 5 y 5° C, añadiendo DSS 50  $\mu\text{M}$  como compuesto de referencia.

Dado que los residuos de His pueden presentar estados diferentes dependiendo de pH, encontrándose cargados positivamente a pH bajo y en su forma neutra a pH superiores a 7, decidimos llevar a cabo la adquisición de espectros de RMN 1D a diferentes pHs con el fin de monitorizar el efecto de la variación de las cargas en la estructura de los péptidos. Se construyeron diagramas de  $\delta$  según el pH de las muestras para las His terminales 1 y 12, los residuos mayormente afectados por la diferente acidez o alcalinidad de las disoluciones. Así podríamos calcular el pKa de

las His dentro del péptido y seríamos capaces de deducir cómo la titulación de las His influía en la estructura y estabilidad de las horquillas β. Adaptando la ecuación de Henderson-Hasselbach a los desplazamientos químicos de los átomos  $^1\text{H}\epsilon$  de los residuos mencionados, obtuvimos valores de pKa de  $5,9 \pm 0,1$  para la His 1 y  $6,8 \pm 0,1$  en el caso de la His 12, menor y mayor respectivamente al valor de pKa = 6,5 observado para una His perteneciente a un péptido desestructurado (Grimsley et al. 2009). Los espectros 1D correspondientes a las muestras con KIAβH y KIAβF realizados a pH básico, para que las His perdiesen su carga positiva, resultaron en una ausencia de estructura para KIAβH y la presencia de precipitados a pH > 7 para el caso de KIAβF.

Centrándonos en la variante KIAβW, las curvas de titulación obtenidas (Figura 37) permitieron deducir un aumento de la población con una conformación específicamente plegada del péptido a medida que aumenta el pH. Al mismo tiempo, se pudimos apreciar una complicidad evidente entre el descenso del valor de los  $\delta$  de His 12 y los de Lys 4 ( $\text{pKa } ^1\text{H}\beta = 6,83 \pm 0,05$  y  $^1\text{H}\gamma = 6,5 \pm 0,1$ ), algo que no ocurriría con el resto de residuos, cuyos desplazamientos químicos no variaban demasiado (0.1-0.3 ppm) al aumentar el pH. Probablemente esto fuese debido a las interacciones



**Figura 37.** Curvas de titulación de His 1 y 12 (átomos  $^1\text{H}\epsilon$ ) y Lys 4 ( $^1\text{H}\beta$  y  $\gamma$ ), generadas a partir de los espectros de RMN adquiridos a partir de muestras con KIAβW 3 mM, en tampón H/NaAc 10 mM y 5 °C, donde se recogen los  $\delta$  de  $^1\text{H}$  a diferentes pH para cada caso.

electrostáticas, tanto en el caso de las cadenas laterales de la Lys como en el caso del grupo imidazol de la His, además de a la interacción favorable entre su carga y el extremo carboxiterminal. Se puso así de manifiesto la importancia de estas His terminales para la estabilidad de la molécula de modo que, tal y como se ha mencionado anteriormente, la capacidad de los grupos imidazol para influir sobre las interacciones coulombianas de los residuos adyacentes afectaría al plegamiento de estos y, con ello, también a la disposición espacial del resto de la molécula. Parece que a diferencia de lo que ocurriría a pHs superiores al pKa del anillo (pKa = 6,5), a pH bajos, cuando existe una mayor proporción de moléculas de KIAβW cuyas His poseían cadenas laterales protonadas, la correcta interacción con los residuos cercanos se encontraba más impedida; la densidad electrónica alrededor de los átomos mencionados no apantallaba demasiado sus señales, es decir, que existía una menor proporción de péptido específicamente plegado.

En los espectros bidimensionales, además de las señales tan apantalladas de la Lys 4 ya mencionadas, tras asignar por completo los espectros obtenidos por RMN, se apreció también un distanciamiento entre los  $^1\text{H}\alpha$  de la Gly 7 ( $\Delta\delta = 0.7$  ppm), reflejando su diastereoisomería, otro claro signo del plegamiento específico ya observado en el caso de los péptidos helicoidales estudiados y un resultado característico de las Gly situadas en los giros que forman parte de este tipo de hebras (Santiveri et al. 2004). Esta separación apenas era notable en el caso de las variantes con His y Phe (0.15 ppm). Aun con todo, aunque según estos resultados existían indicios de una conformación plenamente estructurada, probablemente debida a una estructuración al 100% del esqueleto peptídico, la fracción plegada no pudo ser calculada a partir de los desplazamientos químicos de la Gly 7 ya que, como se demostró anteriormente en los experimentos de CD, el péptido no adoptaba una única estructuración completamente definida ni siquiera a  $-2^\circ\text{C}$ . Esto se dedujo también de los experimentos de RMN realizados en 100%  $\text{D}_2\text{O}$ , en los cuales solo se observó parte de las señales correspondientes a los protones amídicos que formaban el conjunto de puentes de hidrógeno entre residuos adyacentes que estabilizaban la estructura de los péptidos. Por un lado, pudimos apreciar los NOEs creados en torno a la red de puentes de hidrógeno creada entre los átomos de hidrógeno y grupos carbonilo del esqueleto peptídico (por ejemplo, NOEs entre los  $^1\text{HN}$  de Ile 3 e Ile 10, Ile 5 e Ile 8 o Ile 8 y Asp 7) o entre estos y los  $^1\text{H}\alpha$ , alguno de ellos enfrentados (NOEs entre  $^1\text{H}\alpha$  de Trp 2 y Lys 11, Lys 4 y Trp 9 o Asp6 y Gly 7; y NOEs  $^1\text{HN-H}\alpha$  de His 12-Trp 2, Ile 3-Lys 11, Ile 10-Lys 4, Ile 5-Trp 9, Ile 8-Asp 6 e Ile 8-Gly 7). Por el otro, fuimos capaces de detectar los NOEs propios de la red de interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos cercanos, tanto debidas a interacciones electrostáticas o de tipo catión- $\pi$  (por ejemplo, se detectaron NOEs entre  $^1\text{H}\zeta$  de Trp 9 y  $^1\text{H}\beta$  de Lys 11;  $^1\text{H}\zeta$  de Trp 2 y  $^1\text{H}\beta$  de Lys 4; entre  $^1\text{H}\beta$  de Asp 6 y  $^1\text{H}\delta$  de Ile 5;  $^1\text{H}\delta 1$ ,  $\epsilon 1$  o  $\zeta$  de Trp 9 y  $^1\text{H}\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  de Lys 4; o entre  $^1\text{H}\delta 1$ ,  $\epsilon 1$  o  $\zeta$  de Trp 9 y  $^1\text{H}\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  de Lys 4), como a fenómenos de apilamiento entre los grupos indólicos de los Trp (NOEs entre  $^1\text{H}\beta$  y  $^1\text{H}\delta$ ,  $^1\text{H}\epsilon$ ,  $^1\text{H}\zeta$  o  $^1\text{H}\eta$  de los Trp 2 y 9 apilados de forma antiparalela) (Apéndice 7). Las señales correspondientes a los protones del anillo de Trp se encontraban por encima de los 6.5 ppm (región donde aparecerían las señales debidas a NOEs  $^1\text{H}\epsilon$ - $^1\text{H}\zeta$ ), un claro indicio de que, tal y como se pudo deducir de los datos obtenidos durante los experimentos de CD, estaban participando en interacciones por apilamiento y no en interacciones de tipo “cara contra borde”, que fueron descartadas. Los NOEs entre los grupos amino de residuos inmediatamente contiguos son más propios de las conformaciones en hélice  $\alpha$ . Por ello, fueron obviados los NOEs correspondientes a las estructuras estadísticamente aleatorias que se generaban hasta alcanzar el plegamiento energéticamente más favorable. Sí se consideraron aquellos NOEs establecidos con los grupos amino de los residuos que se encuentran fuera de las hebras de la horquilla y forman el giro entre ellas. En definitiva, estamos ante un péptido estructurado de forma

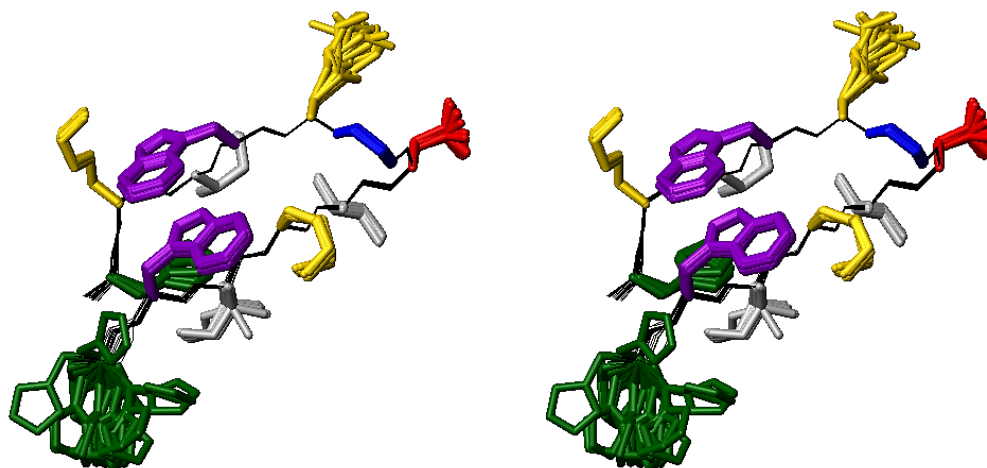
específica y estable, aunque no se llega a alcanzar una población formada totalmente por estructuras 100% plegadas, existiendo también cierta fracción de moléculas en su forma desplegada.

#### 6.2.4. Cálculo de la estructura mediante dinámica molecular

Empleando los desplazamientos químicos observados al resolver por completo los espectros obtenidos por RMN (Apéndice 6), haciendo uso de CYANA y AMBER, el software empleado para el cálculo de las estructuras de KIA7I y RIA7, pudimos calcular la estructura representativa del péptido KIA $\beta$ W que, tal y como indican sus valores para la función blanco y de RMSD, se trata de una estructura bien definida (Figura 38). En la conformación resultante los residuos de Trp se disponían de modo que las interacciones por apilamiento entre sus átomos se encontraban favorecidas sobre los emparejamientos “cara contra borde”, algo que ya se había supuesto de manifiesto después de no observarse las señales entre los  $^1\text{H}\epsilon$  y  $^1\text{H}\zeta$ , que son representativas de esta última clase de disposición y aparecen en la región de los espectros NOESY comprendida entre 5 y 7 ppm (Eidenschink et al. 2009; Santiveri and Jimenez 2010). Este tipo de interacciones en diagonal entre residuos de Trp, en forma de pares de WW, favorecen la estabilidad de las horquillas  $\beta$  incluso en mayor medida que los puentes disulfuro. Como pudo apreciarse en el modelo estructural, se establecía un gran número de interacciones entre los anillos indólicos y las cadenas laterales de los residuos adyacentes, especialmente los cargados positivamente, gracias principalmente a interacciones de tipo catión- $\pi$  (Santiveri and Jimenez 2010). Ambos residuos de Trp se encontraban enfrentados de forma antiparalela entre sí y orientados hacia el exterior, más alejados de los puentes de hidrógeno formados entre los átomos del esqueleto peptídico, lo que apoyaría la idea de que los pares WW no ejercen un efecto estabilizador sobre este tipo de interacciones dipolo-dipolo. En vista de estos resultados y tras estudiar modelos en los que se simuló una mutación en estas posiciones, introduciendo residuos de His o Phe en las estructuras de KIA $\beta$ W, fue evidente suponer que a causa del menor volumen de sus cadenas laterales, era imposible la formación de pares HH o FF. Era de esperar entonces que las secuencias de KIA $\beta$ H y KIA $\beta$ F no hubiesen podido dar lugar a conformaciones similares a las de la variante con el par WW.



**Figura 38.** Imagen estereoscópica de las 20 estructuras de KIAβW energéticamente más favorables, calculadas a partir de la asignación de un total de 176 picos, entre los que se observaron 121, 31 y 24 NOEs de corto, medio y largo alcance, respectivamente. Las cadenas laterales de las His están representadas en verde, las Ile en gris, las Lys en amarillo, la Gly en azul, el Asp en rojo y los Trp en morado. Tras los cálculos realizados para obtener estas 20 estructuras, se llevó a cabo además una serie de ciclos de refinamiento en un ambiente acuoso empleando AMBER. Adicionalmente, a través de programas de cálculo de interacciones intramoleculares (Gallivan and Dougherty 1999; Tina et al. 2007) se obtuvo información acerca de las diferentes interacciones presentes en las horquillas β. Bajo la imagen, en unas tablas, se resumen los diferentes datos estadísticos del cálculo de la estructura, así como los resultados adquiridos tras los análisis de interacciones intramoleculares.



Restricciones de distancia	NOEs
Corto alcance, (i-j) ≥ 1	121
Medio alcance, (i-j) < 5	31
Largo alcance, (i-j) ≥ 5	24
<b>Total</b>	<b>176</b>

RMSD	(Å)
Esqueleto peptídico (N, Cα, C')	0,210
Todos los átomos pesados	0,591

Gráfico de Ramachandran*	%
Ángulos en las regiones más favorecidas	87,2
Ángulos en regiones permitidas	12,8
Ángulos en regiones adicionales	0
Ángulos en regiones no permitidas	0

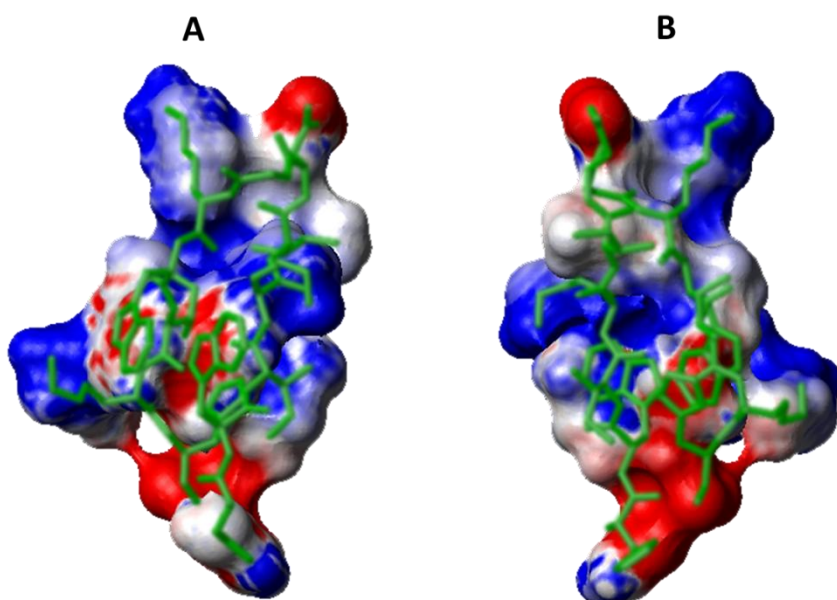
\*Apéndice 8.

Asignaciones estereoespecíficas	9
Restricciones angulares (Φ,Ψ)	16
Función blanco en CYANA (Å <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>	0,24
Energía en AMBER (Kcal·mol <sup>-1</sup> ) <sup>+</sup>	-324 ± 4
Violación máxima (Å) <sup>+</sup>	0,15
Nº de Violaciones > 0,4 Å <sup>+</sup>	0
Longitudes de enlace (Å) <sup>+</sup>	0,0099 ± 0,0002
Ángulos de enlace (°) <sup>+</sup>	2,97 ± 0,02

<sup>+</sup>Valores promedio de los 20 conformeros.

Interacciones intramoleculares
<b><u>Interacciones hidrófobas (≤ 5 Å)</u></b>
Trp 2 - Trp 9
Ile 5 - Ile 10
<b><u>Enlaces de H en el esqueleto (NH-OC)</u></b>
Ile 5 - Lys 8
Gly 7 - Ile 5
Lys 8 - Ile 5
Ile 10 - Ile 3
His 12 - His 1
<b><u>Entre residuos aromáticos (4,5 - 7 Å)</u></b>
Trp 2 - Trp 9
(Ángulo diedro = 157,98°)
<b><u>Catión-π (≤ 6 Å)</u></b>
Trp 2 - Lys 4 (143,23°)
Trp 9 - Lys 11 (121,49°)

Además de la estabilidad otorgada por el par WW, se tuvieron en cuenta también los 5 puentes de hidrógeno establecidos entre los grupos amida del esqueleto peptídico, que contribuían a aumentar la estabilidad entre las hebras. La horquilla presentaba cierta torsión, de modo que el ángulo formado entre el puente de hidrógeno en los extremos y el que se encuentra antes del giro es de unos 150°. En una de las caras se establecían interacciones entre el grupo imidazol de la His 12 y las cadenas laterales hidrófobas de Ile 3, Ile 5 e Ile 10 (Figura 39B). En el giro, el grupo carboxilo de Asp 6 se encontraba a unos 5 Å del grupo amino cargado de la Lys 8, lo que favorecería las interacciones electrostáticas entre ambos. En la cara opuesta, ambos residuos de Trp establecían interacciones por apilamiento entre los átomos de sus cadenas laterales. Los grupos amino de la Lys 4 y la Lys 11 se disponían a 3,2 Å de los anillos indólicos del Trp 2 y el Trp 9, por lo que las interacciones de tipo catión- $\pi$  entre ellos se verán favorecidas (Figura 39A). Por su parte, la cadena lateral de la His 1 parecía adoptar varias conformaciones diferentes. Esto era consistente con los resultados obtenidos al analizar las titulaciones realizadas, de forma que la desprotonación de His 12 parecía afectar en mayor medida al plegamiento global de la molécula debido a que establecía un mayor número de interacciones con los residuos cercanos, lo que a su vez afectaba a las conexiones que estos pudiesen tener con los aminoácidos contiguos, algo que no era tan evidente para la His 1.



**Figura 39.** Diagramas de superficie en los que se refleja la distribución del potencial electrostático existente en KIA $\beta$ W, tanto en la zona donde se detectan las interacciones entre el par WW y las Lys adyacentes (**A**), orientados hacia un lado de la horquilla, como en el lado opuesto, donde tienen lugar las interacciones entre distintas Ile e His 12 (**B**). El potencial eléctrico de las cadenas laterales de los distintos residuos, desde  $-0,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{e}^{-1}$  (rojo) hasta  $0,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{e}^{-1}$  (azul), se calculó empleando MolMol (Koradi et al. 1996) y las estructuras generadas gracias a los datos RMN (en verde, el esqueleto peptídico con los átomos pesados de una de ellas). La figura B se corresponde con la molécula representada en A, pero girada 180° sobre el eje vertical.

### 6.3. Propiedades de interacción con NTPs de manera específica

Observando el modelo estructural calculado para KIAβW, hay que destacar el hecho de que los residuos cargados positivamente estaban orientados hacia el par WW y se disponían hacia el exterior de la estructura. Esto favorecería sobremanera la interacción con ligandos aniónicos presentes en el medio, tales como ácidos nucleicos y nucleótidos. Teniendo esto en mente, se diseñó una serie de experimentos de fluorescencia y RMN para tratar de encontrar evidencias de la unión de este tipo de péptidos a los diferentes NTPs: ATP, GTP, CTP y UTP. La detección de interacción es importante para la posible formación de péptidos KIAβW en un ambiente prebiótico en el que estuviesen también presentes las unidades más simples del RNA.

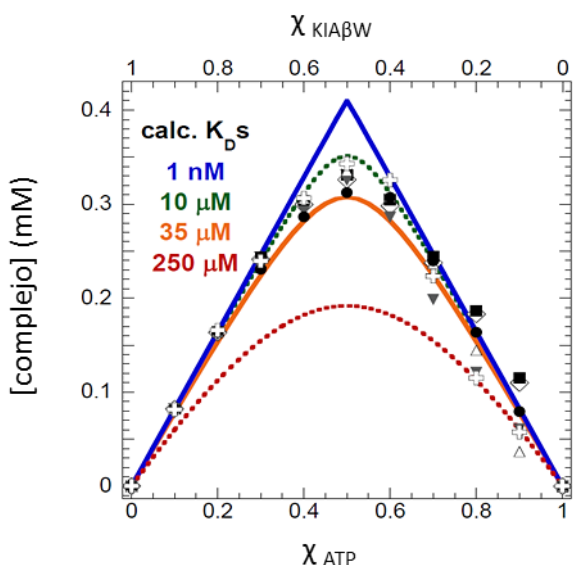
#### 6.3.1. RMN 1D: estequiometría 1:1 para los complejos KIAβW·ATP

Para elucidar la estequiometría reflejada durante la formación de los complejos entre moléculas de péptido y ATP, se recurrió a una batería de 11 experimentos 1D  $^1\text{H}$ . En ellos se pusieron a prueba diferentes fracciones molares de ATP ( $\chi_{\text{ATP}} = [\text{ATP}]/([\text{ATP}] + [\text{KIA}\beta\text{W}])$  (4)), desde 0 hasta 1, en intervalos con una diferencia de 0,1. Usando los  $\delta$  de átomos clave, tales como  $^1\text{H}_8$  y  $^1\text{H}_{1'}$  del ATP o, por parte del péptido, algunos de los protones de W2 ( $^1\text{H}\zeta_3$ ), K4 ( $^1\text{H}\epsilon_2$ ,  $^1\text{H}\epsilon_3$ ,  $^1\text{H}\gamma_2$  y  $^1\text{H}\gamma_3$ ), G7 ( $^1\text{H}\alpha_3$ ), W9 ( $^1\text{H}\zeta_3$ ), K11 ( $^1\text{H}\alpha$ ) y H12 ( $^1\text{H}\delta_2$ ), pudimos construir diagramas de Job basándonos en el siguiente grupo de ecuaciones para realizar el tratamiento de los datos usando KaleidaGraph (Butterfield and Waters 2003) (Figura 40):

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{R}} + \frac{\Delta_{\text{o}}}{2 \cdot [\text{R}_0] \cdot \left\{ [\text{R}_0] + [\text{S}_0] + K_{\text{D}} - \sqrt{([\text{R}_0] + [\text{S}_0] + K_{\text{D}})^2 - 4 \cdot [\text{R}_0] \cdot [\text{S}_0]} \right\}} \quad (5)$$

$$[\text{complejo}] = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{R}}}{\Delta_{\text{o}}} \cdot [\text{R}_0] \cdot \chi_{\text{R}_0} \quad (6)$$

Siendo,  $\delta_{\text{obs}}$  y  $\delta_{\text{R}}$  los desplazamientos químicos observados en presencia y en ausencia de ATP respectivamente,  $\Delta_{\text{o}}$  la máxima diferencia entre  $\delta$  observada cuando estuviésemos ante la máxima población de complejos que se podía formar,  $[\text{R}_0]$  y  $[\text{S}_0]$  las concentraciones de péptido y ATP que participaban en la formación de los complejos y  $K_{\text{D}}$  la constante de disociación de los mismos.



**Figura 40.** Diagrama de Job obtenido a partir de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de muestras con proporciones ATP:KIAβW diferentes, que nos permite calcular la constante de disociación de los complejos ( $K_D$ ), comparando las curvas experimentales resultantes con los valores calculados para constantes determinadas. Encontramos así que la  $K_D$  de los complejos formados entre el péptido y el ATP parece encontrarse en torno a 20  $\mu$ M. Se adquirieron espectros para muestras con diferentes concentraciones de ATP, aumentando un 10% la proporción de ligando con respecto a la concentración de péptido. Los experimentos se llevaron a cabo en 99.9% de  $D_2O$ , en presencia de D/NaAc 10 mM a pH 5. Se programaron 32 barridos por espectro y se usaron pulsos con presaturación para reducir la intensidad de la señal del agua detectada a causa de trazas residuales detectadas.

Al igual que ocurriría más adelante durante los experimentos de fluorescencia, en esta ocasión tampoco se pudo obtener un valor representativo de  $K_D$  observable para las muestras con GTP, ya que el cálculo realizado con los átomos elegidos daba resultados demasiado variados como para poder obtener una constante de disociación con suficiente precisión. Ello fue probablemente debido a que, en el caso de la unión a GTP, existían poblaciones de péptidos con conformaciones plegadas, desplegadas y parcialmente plegadas, según la región de la horquilla que estudiásemos. Los valores de  $K_D$  se encontraban en un margen demasiado grande como para asegurar cuál era la constante que pertenecía a la forma más estable del complejo.

### 6.3.2. Espectros de fluorescencia propios de fluoróforos situados en la superficie

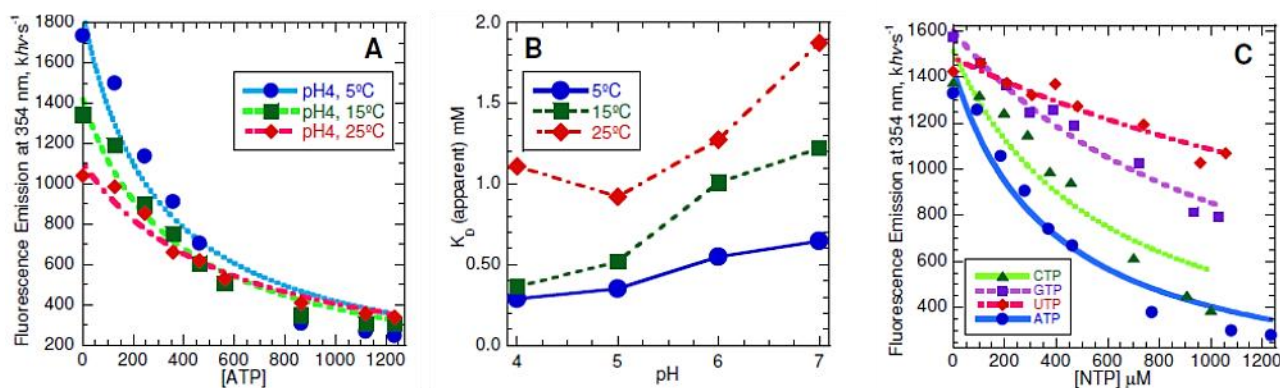
Haciendo uso del espectrofluorímetro Jobin Yvon Fluoromax 4, empleado también en los análisis de fluorescencia de los péptidos KIA7 y RIA7, llevamos a cabo ensayos de fluorescencia para una serie de muestras de KIAβW en presencia de ATP, GTP, CTP y UTP, con el fin de analizar una posible especificidad en la unión entre los péptidos y los distintos nucleótidos. La batería de experimentos realizados nos permitió obtener múltiples resultados de los valores de fluorescencia según la concentración de NTP a diferentes temperaturas y pHs. Tras recabar los datos de las señales detectadas a la longitud de onda de emisión y no detectar ningún tipo de dispersión de luz, pudimos afirmar que no ocurrían fenómenos de agregación entre los componentes de las muestras. La

fluorescencia detectada a la  $\lambda_{Em}$  es variable, dependiendo de los factores de apantallamiento que afecten a los residuos aromáticos, ya sea por una internalización de estos en la estructura de la molécula o a causa de la unión a ligandos. Así, se realizaron tres experimentos por cada una de las condiciones propuestas, los cuales a su vez se repitieron por triplicado. Inicialmente, en presencia de ATP se pusieron a prueba diferentes condiciones de pH (4, 5, 6 y 7) y temperatura (5, 15 y 25 °C), con el fin de realizar un análisis comparativo de los resultados obtenidos y poder optimizar el procedimiento. Tras la optimización, con el resto de compuestos únicamente se realizaron los ensayos a 5° C y pH 5. Como resultado, para el caso de los complejos formados entre KIAβW y ATP a pH 5 y 5° C, se obtuvo una  $K_D = 0,7$  mM. Estas fueron las únicas muestras que dieron lugar a gráficas de disociación no lineales a las que poder aplicar la siguiente ecuación, de modo que a menor pH y mayor T se lograrían valores de  $K_D$  aparente mayores (Figura 41):

$$\text{ATP} \cdot \text{KIA}\beta\text{W} \xrightleftharpoons{K_D} \text{ATP} + \text{KIA}\beta\text{W} \quad I = \frac{I_o + I_\infty \cdot \frac{[L]}{K_D}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (7)$$

Donde I,  $I_o$  e  $I_\infty$  son, respectivamente, las intensidades de fluorescencia observada, inicial y la detectada cuando se alcanza la saturación en la formación de complejos; [L] es la concentración de ligando, en este caso un NTP y  $K_D$  es la constante de disociación.

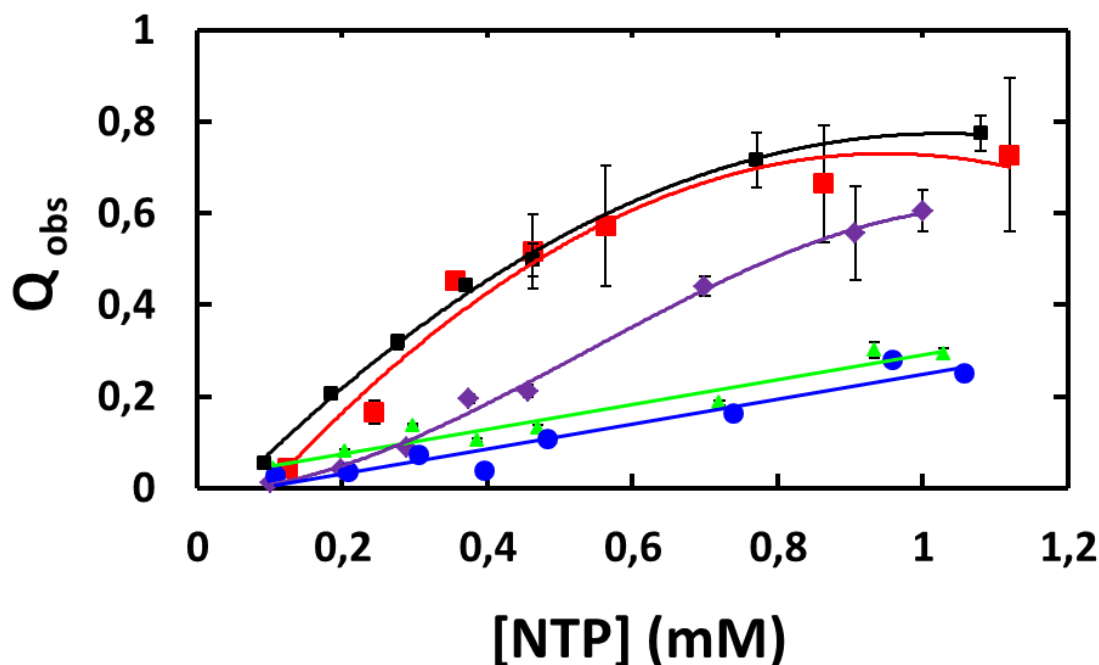
Aunque los NTP presentan cierta absorción de luz a la  $\lambda_{Ex}$  por sus elevados coeficientes de extinción, los valores no se corrigieron ya que la pérdida de señal era despreciable. Lo mismo ocurría con las diferencias entre los análisis en los que existía cierta dilución del péptido al añadir cantidades crecientes de NTP y los ensayos que se llevaron a cabo a concentraciones constantes de KIAβW. Los resultados obtenidos fueron prácticamente idénticos por lo que, en pos de la optimización experimental, esa ligera dilución se consideró también despreciable. Como veremos más adelante, la evidente diferencia entre la constante de disociación calculada mediante RMN y la obtenida de los ensayos de fluorescencia era debida a las pequeñas concentraciones de compuestos empleadas en la preparación de las muestras, por lo que se consideró esta constante como una  $K_D$  aparente. No obstante, dada la gran optimización de los recursos a la hora de realizar estos experimentos de fluorescencia, los datos observados fueron perfectamente viables a la hora de establecer comparaciones entre los resultados obtenidos con los diferentes nucleótidos puestos a prueba.



**Figura 41.** Experimentos de fluorescencia llevados a cabo para muestras de KIAβW. **A)** Gráfico de intensidad de la fluorescencia en función de la concentración de ATP a pH 4 y diferentes temperaturas. Se puede observar que la temperatura no influye demasiado en la capacidad del ligando para apantallar la fluorescencia emitida por los Trp del péptido. El apantallamiento térmico del que se habla en el apartado 8.4.3, en este caso parece ser despreciable a causa de la estabilidad de las interacciones existentes entre los residuos de la horquilla. **B)** Gráfico en el que se recogen las diferentes  $K_D$  calculadas a partir de los valores de intensidad de la fluorescencia detectada según los distintos valores de pH y temperatura puestos a prueba. A temperatura y pH mayores es cuando los valores de  $K_D$  aparente se hacen mayores. **C)** Experimento de fluorescencia que muestra las distintas gráficas obtenidas a pH 4 y 5 °C para los cuatro NTPS. La ausencia de curvatura en el caso de los perfiles de las muestras con GTP, UTP y en menor medida CTP, no hizo posible la aplicación de la ecuación 7 para el cálculo de una  $K_D$  aparente. Mientras que la curvatura de las gráficas indica la presencia de unos fluoróforos situados en la superficie, más accesible a los ligandos, su linealidad por el contrario, es un indicativo de que, o bien los fluoróforos se encuentran enterrados dentro de la estructura peptídica, o se unen muy débilmente a los ligandos que impiden la detección de su fluorescencia. Estos resultados se basan en los experimentos de fluorescencia realizados a una concentración de péptido stock de 254 μM y de 4,3 mM para el caso de los NTPs. La longitud de onda elegida para el haz de excitación fue de 297 nm, con el fin de detectar la fluorescencia emitida por los residuos de Trp a una  $\lambda = 354$  nm ( $\lambda_{Abs} = 280$  nm y  $\epsilon_{max} = 5500$  M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> en solución acuosa a pH 7), al mismo tiempo que se intenta minimizar la pérdida debida a la absorbancia de luz por parte de las bases nitrogenadas de los nucleótidos trifosfato ( $\lambda_{Abs} = 259, 253, 271$  y 262 nm para ATP, GTP, CTP y UTP respectivamente con  $\epsilon_{max}$  de 15400, 13700, 9000 y 10000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, en solución acuosa a pH7) y así poder asegurarnos de que la señal recibida se debía exclusivamente a los residuos del péptido (Lakowicz 2006).

Adicionalmente, se compararon las muestras que contenían KIAβW y ATP con las muestras a las que se añadía GTP, CTP o UTP y se construyó un diagrama del apantallamiento (“quenching”, Q) sufrido por la señal de fluorescencia emitida por los Trp, tras la unión de los diferentes NTPs y la formación de los complejos (Figura 42). El máximo de fluorescencia detectado a 354 nm era propio de residuos de Trp situados en la superficie de las proteínas (Albani 2008). La curvatura de las gráficas también era debida a la diferente accesibilidad que presenta cada uno de los dos residuos ante la interacción con los ligandos que provocaban el apantallamiento, tal y como mostraron los diagramas de Stern-Volmer en los que las muestras con ATP y GTP parecían seguir un patrón propio de apantallamientos dinámicos ( $K_{SVobs} > 1$  mM<sup>-1</sup>). Es posible que el análisis de fluorescencia de compuestos con más de un fluoróforo sea complejo, pero sí que pudimos extraer algunas conclusiones respecto al apantallamiento que sufrían los dos Trp en función de su disposición y la estabilidad de la unión a cada NTP. Los residuos de Lys y sobre todo His (según el

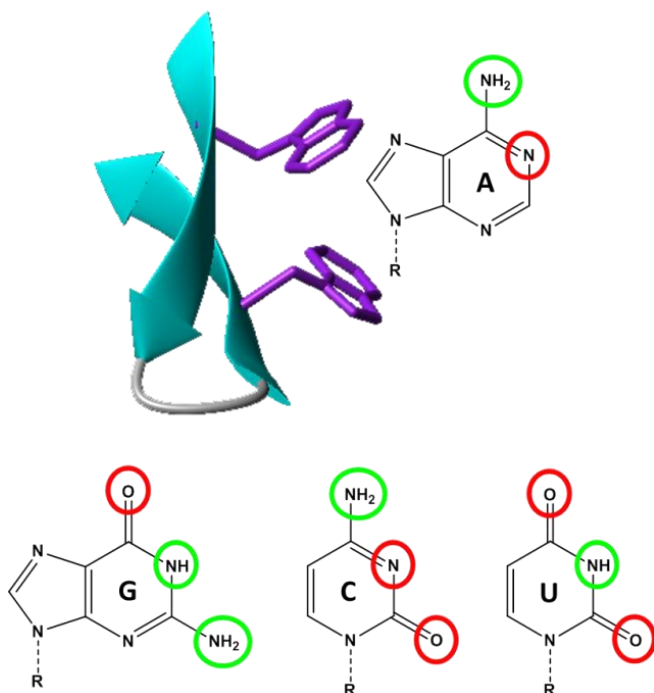
pH del medio) y los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos cercanos a los Trp, podrían provocar también cierto apantallamiento dinámico debido a la transferencia electrónica entre ellos (Alston et al. 2004; Lakowicz 2006).



**Figura 42.** Diagrama de apantallamiento de la fluorescencia emitida por los Trp de KIAβW a 354 nm ( $\lambda_{\text{Ex}} = 297$  nm), a diferentes concentraciones de ATP (rojo), GTP (verde), CTP (morado) o UTP (azul), una concentración de péptido inicial de 320  $\mu\text{M}$ , pH 5 y 5  $^{\circ}\text{C}$ .  $Q_{\text{obs}} = (I_0 - I_{\text{obs}}) / I_0$ , donde  $I_0$  e  $I_{\text{obs}}$  son las intensidades de fluorescencia detectada en ausencia y en presencia de los diferentes NTPs, según las distintas concentraciones empleadas. Las señales de apantallamiento correspondientes a las muestras a las que se añade ATP manteniendo la concentración de péptido constante, sin que exista ningún tipo de dilución (negro), poseen valores de apantallamiento similares a las muestras en las que dicha dilución se considera despreciable. La desviación estándar teniendo en cuenta los valores obtenidos durante los ensayos por triplicado se muestra en forma de líneas horizontales. En los casos en los que estas líneas no son visibles, el error en la medida es tan bajo que queda oculto tras los símbolos empleados para la representación de los resultados.

Las diferencias en la dependencia de este apantallamiento, en función de la concentración de NTP, se observaron sobre todo en los resultados obtenidos con ATP y CTP, frente a los logrados para GTP y UTP, alcanzándose los mayores valores de apantallamiento en el caso de la interacción con la adenosina. Puesto que los cuatro nucleótidos tienen en común la ribosa y los tres grupos fosfato, dejando a un lado las diferentes especies que se puedan formar de cada uno de los cuatro compuestos en función del pH (predominaría la forma  $\text{NTP}^{4-}$ ) (Crisponi et al. 1993), parece que existía cierta especificidad dependiendo de los sustituyentes de la base nitrogenada que pudiesen formar interacciones con los residuos del péptido más cercanos (Lys y Trp) y cuáles son los sustituyentes del nucleótido que quedaban más alejados del péptido y expuestos al medio, pudiendo establecer interacciones con la moléculas de agua circundantes (Figura 43).





**Figura 43.** Esquema representativo en el que se ilustra la influencia de los sustituyentes más alejados de la estructura peptídica, en el caso de las bases nitrogenadas de los diferentes NTPs. Dichos sustituyentes serían capaces de actuar como grupos donadores (verde) o aceptores (rojo) si se estableciesen puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio, pudiendo entorpecer en mayor o menor medida la estabilidad de la unión a KIAβW (ATP o A > CTP o C > GTP o G > UTP o U). La capacidad de los diferentes NTPs para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua (U > G > C > A) parece estar directamente relacionada con la unión al péptido y, por tanto, este modelo estaría de acuerdo con los resultados obtenidos durante los ensayos de apantallamiento de la fluorescencia explicados anteriormente. Los residuos de Trp del par WW, que se separan cierto grado para acomodarse a la unión con el ATP, se encuentran coloreados en morado.

El ATP es el nucleótido trifosfato que mejor parecía interactuar con los Trp, apantallándose mucho más la fluorescencia emitida a una concentración mucho menor que en el caso del resto de NTPs puestos a prueba. Existía una evidente diferencia entre el apantallamiento que sufre la señal emitida por los Trp en el caso de la unión a ATP ( $Q_{\text{obs}} \approx 0,75$  con  $[\text{ATP}] = 1\text{mM}$ ), seguido del detectado en las muestras de CTP ( $Q_{\text{obs}} \approx 0,60$ ) y, muy por debajo de estos, el experimentado por las muestras en presencia de GTP y UTP ( $Q_{\text{obs}} \approx 0,30$ ). Estos valores descartaban que la interacción de KIAβW con los NTPs estuviese influenciada por impedimentos en la disposición espacial de los compuestos, ya que valores similares de apantallamiento ocurrían tanto en el caso de los nucleótidos trifosfato con purinas (ATP y GTP) como con pirimidinas (CTP y UTP). Parece que los grupos fosfato y los sustituyentes de las bases nitrogenadas cercanos a la ribosa interactuarían con los anillos indólicos de los Trp y algunos de los átomos que se encontrasen próximos a ellos. No obstante, el resto de grupos más alejados del azúcar se adaptarían peor a la estructura del péptido, sobre todo cuanto más electronegativo fuese el carácter de los sustituyentes más expuestos al medio, situados en las posiciones 2 y 4 de las pirimidinas y 2 y 6 de las purinas: grupos amino en el caso de ATP; grupos carbonilo en el caso de UTP; y  $\text{NH}_2$  en la posición 4 o 2 y  $\text{C}=\text{O}$  en la posición 2 o 6 para los casos de CTP o GTP, respectivamente. Es posible que las moléculas de NTP con grupos carbonilo más expuestos y más alejados de la influencia electrostática de los pares WW de KIAβW (como sería el caso de GTP, UTP y, en menor medida, CTP) viesen favorecida también su unión a

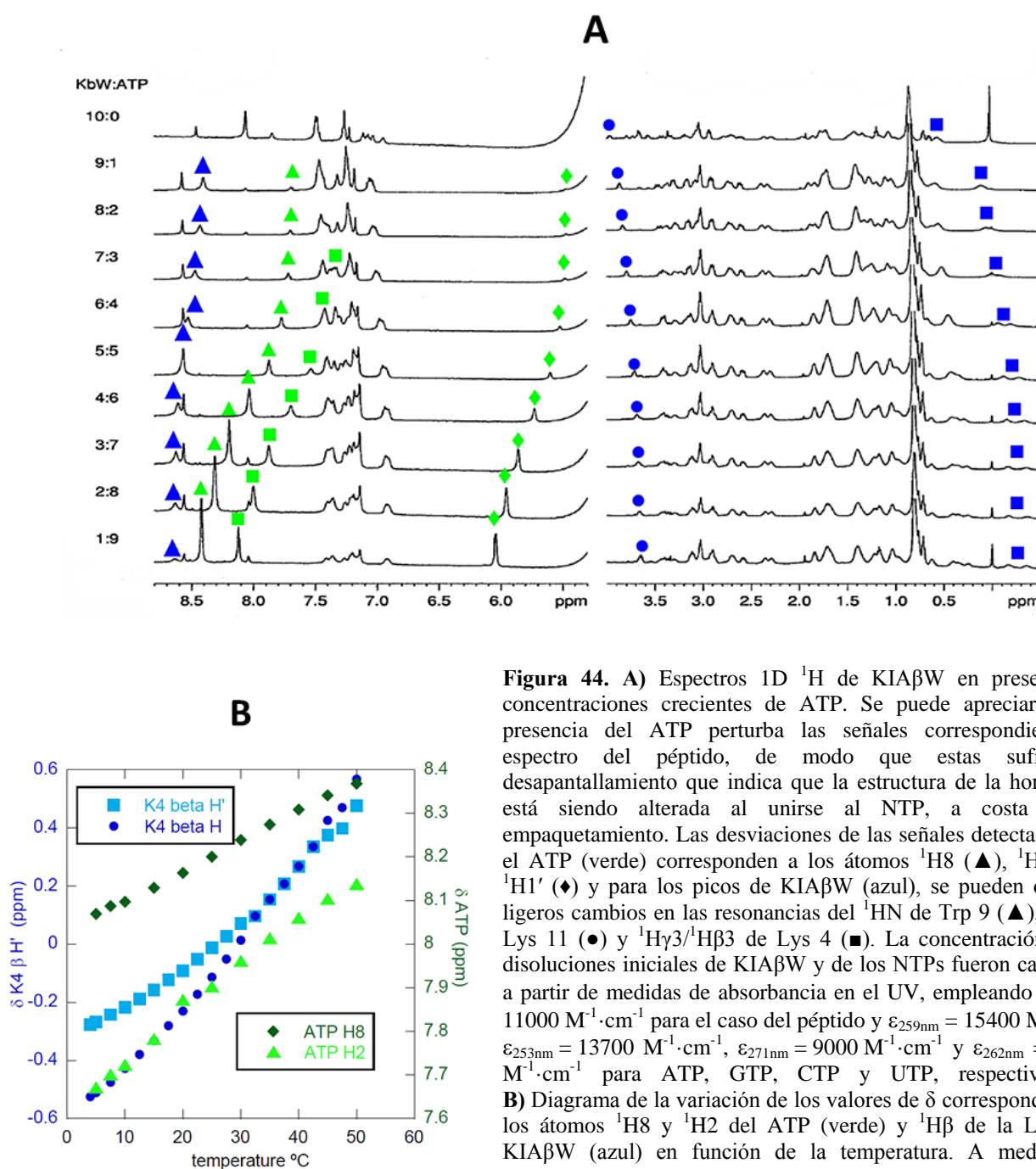


las moléculas de agua del medio a través de puentes de hidrógeno. Se establecería entonces una competitividad entre la unión de estos NTPs a los residuos del péptido y a las moléculas del disolvente, lo que afectaría de forma negativa a la unión con KIA $\beta$ W y, por extensión, evitaría el apantallamiento de la señal emitida por los Trp.

### 6.3.3. RMN: NOEs intermoleculares y desplazamiento de señales según pH y T

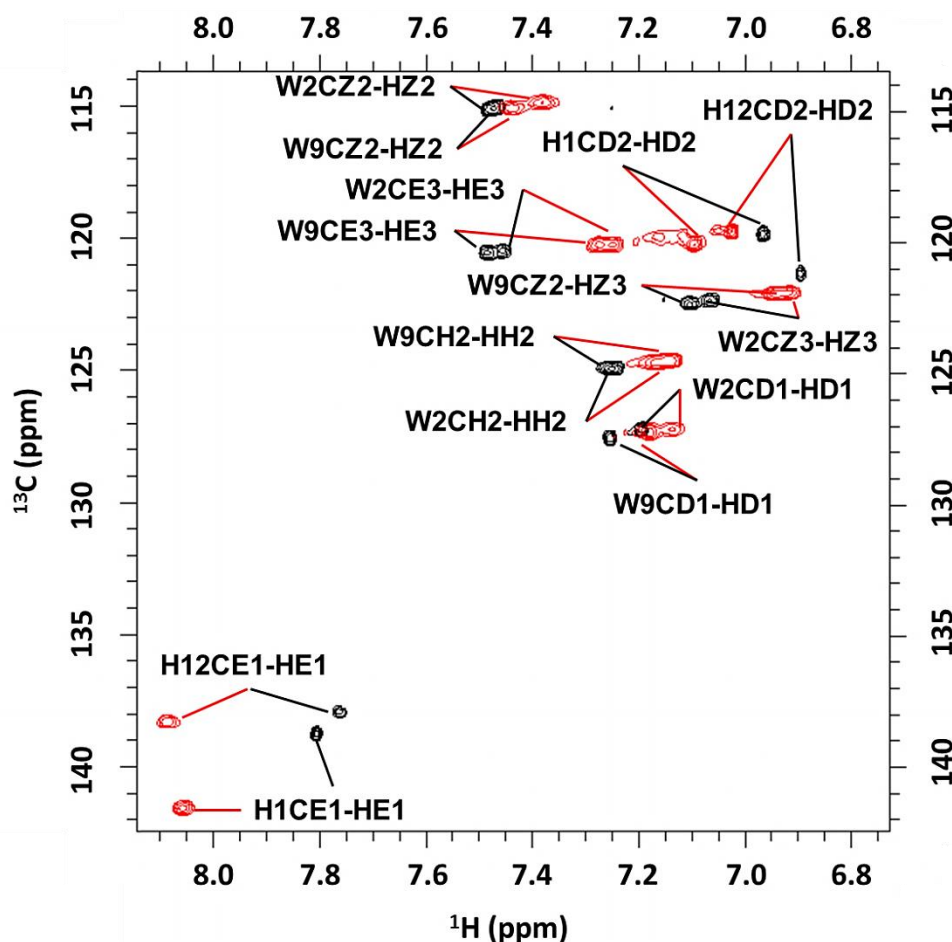
Inicialmente, se monitorizó el efecto de la temperatura sobre una mezcla de KIA $\beta$ W y ATP mediante la adquisición de espectros de RMN 1D  $^1\text{H}$ , primero aumentando la temperatura desde 5 a 50° C y después observando los efectos de un enfriamiento de la muestra desde 47,5 hasta 4° C. Parece que era en condiciones de baja temperatura cuando encontrábamos una mayor proporción de péptido específicamente plegado aunque, de nuevo, no se observaban los picos correspondientes a una estructura completamente plegada- A temperaturas elevadas tampoco se detectaban solamente las señales representativas de una población de péptido formada mayoritariamente por las conformaciones desordenadas. Esto, al igual que ocurría en los ensayos del péptido de forma aislada, nos daba a entender que existía un equilibrio entre ambas construcciones, es decir, que la transición entre estructuras plegadas y conformaciones en estado desnaturalizado tenía lugar de forma gradual hacia esta última disposición, a medida que aumentaba la temperatura, y mostraba además, que al disociarse el ATP el péptido se desplegaba. Los resultados obtenidos durante la desnaturalización térmica y los recogidos al enfriar la muestra eran similares y no se apreciaban fenómenos de agregación relevantes, seguramente gracias a la carga neta positiva del péptido que lo hacía más soluble en agua. Por tanto, pudo afirmarse que los cambios en las estructuras son reversibles, aunque no parecían poseer la estabilidad característica de los péptidos prebióticos KIA7 y RIA7 estudiados anteriormente, cuyas propiedades de estabilidad y plegamiento se asemejaban más a las observadas en el plegamiento de proteínas existentes en la naturaleza (López de la Osa et al. 2007; Diez-García et al. 2011).

En la titulación llevada a cabo para diferentes proporciones molares de KIAβW respecto de ATP, pudieron observarse cambios evidentes en los picos correspondientes a  $^1\text{H}$  de residuos del péptido. Los espectros 1D  $^1\text{H}$  adquiridos a  $5^\circ\text{C}$  y pH 5 mostraban claramente un desplazamiento de las señales, tanto del ATP ( $^1\text{H}_8$  -0.7 ppm-,  $^1\text{H}_2$  -0.8 ppm-,  $^1\text{H}_{1'}$  -1 ppm-), como del péptido (Lys 4  $^1\text{H}_{\gamma 3}/^1\text{H}_{\beta 3}$  -0.9 ppm-, Trp 9  $^1\text{H}_\text{N}$  -0.25 ppm-, Lys 11  $^1\text{H}_\alpha$  -0.3 ppm-) (Figura 44A). Estos cambios en los  $\delta$  de los protones detectados para ambos compuestos eran también observables al elevar la temperatura (Figura 44B).



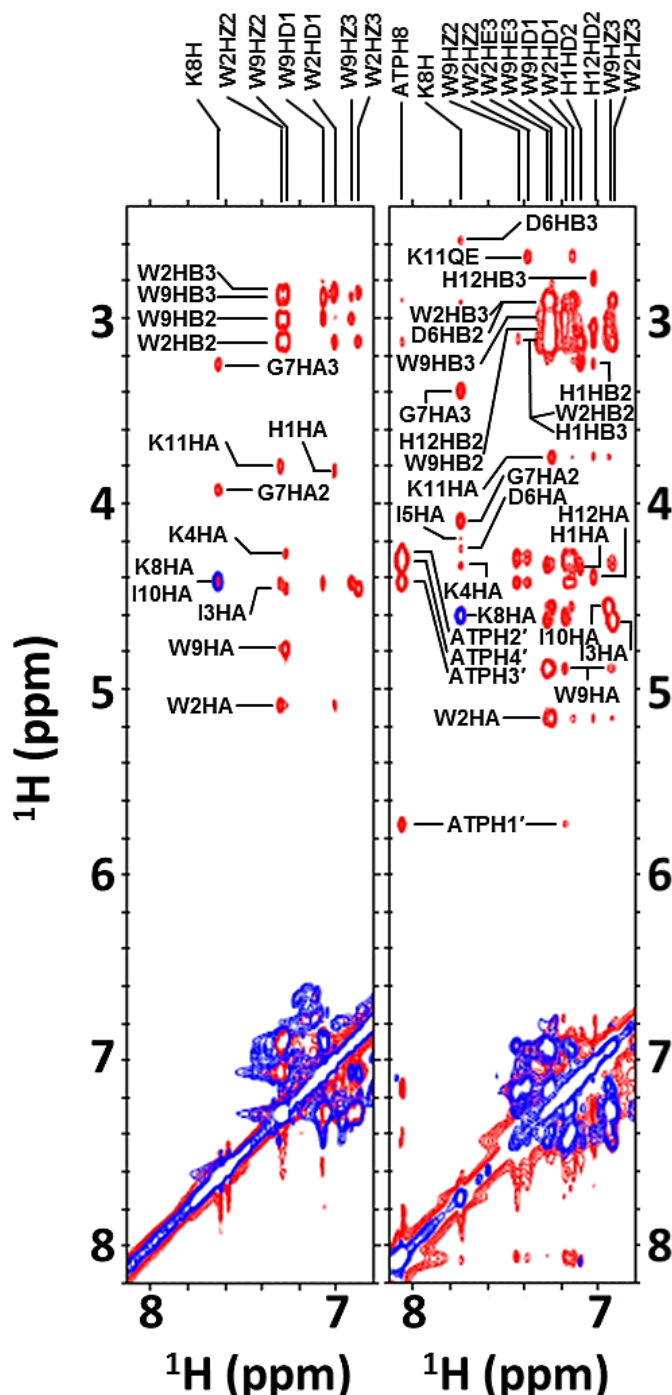
**Figura 44. A)** Espectros 1D  $^1\text{H}$  de KIAβW en presencia de concentraciones crecientes de ATP. Se puede apreciar que la presencia del ATP perturba las señales correspondientes al espectro del péptido, de modo que estas sufren un desapantallamiento que indica que la estructura de la horquilla  $\beta$  está siendo alterada al unirse al NTP, a costa de su empaquetamiento. Las desviaciones de las señales detectadas para el ATP (verde) corresponden a los átomos  $^1\text{H}_8$  (▲),  $^1\text{H}_2$  (■) y  $^1\text{H}_{1'}$  (◆) y para los picos de KIAβW (azul), se pueden observar ligeros cambios en las resonancias del  $^1\text{H}_\text{N}$  de Trp 9 (▲),  $^1\text{H}_\alpha$  de Lys 11 (●) y  $^1\text{H}_{\gamma 3}/^1\text{H}_{\beta 3}$  de Lys 4 (■). La concentración de las disoluciones iniciales de KIAβW y de los NTPs fueron calculadas a partir de medidas de absorbancia en el UV, empleando  $\epsilon_{280\text{nm}} = 11000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para el caso del péptido y  $\epsilon_{259\text{nm}} = 15400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{253\text{nm}} = 13700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{271\text{nm}} = 9000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{262\text{nm}} = 10000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para ATP, GTP, CTP y UTP, respectivamente. **B)** Diagrama de la variación de los valores de  $\delta$  correspondientes a los átomos  $^1\text{H}_8$  y  $^1\text{H}_2$  del ATP (verde) y  $^1\text{H}_{\beta}$  de la Lys 4 en KIAβW (azul) en función de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura aparece un desapantallamiento de las señales, lo que refleja un peor plegamiento de la estructura.

Además, se adquirieron espectros 2D (NOESY, TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC en abundancia natural, estos últimos tanto para la región aromática como alifática, a diferentes anchuras espectrales) para muestras de KIAβW en presencia de ATP. En ellos volvían a ser evidentes los cambios en las señales observadas también en los espectros 1D durante la titulación en presencia de ATP, modificándose el empaquetamiento del péptido para mantener la unión con el ligando (Figura 45).



**Figura 45.** Zona del espectro de RMN 2D heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC en la que se detectan las señales correspondientes a los protones de las cadenas laterales aromáticas de las muestras de KIAβW antes (negro) y después (rojo) de añadir el ATP. Las muestras estaban compuestas por péptido a una concentración de 6 mM, en presencia o no de ATP 12 mM, en tampón H/NaAc 10 mM y con DSS 50  $\mu\text{M}$ . Los espectros se adquirieron a pH de 6.4 y 5  $^\circ\text{C}$  de temperatura, empleando un tiempo de mezcla de 150 ms.

Entre las señales encontradas para las muestras con ATP, se detectaron NOEs entre los átomos de hidrógeno de las cadenas laterales de Trp 2 ( $^1\text{H}\beta$ ,  $^1\text{H}\delta$ ,  $^1\text{H}\epsilon$ ,  $^1\text{H}\eta$  y  $^1\text{H}\zeta$ ) y Trp 9 ( $^1\text{H}\epsilon$ ,  $^1\text{H}\eta$  y  $^1\text{H}\zeta$ ) y los hidrógenos del adenosín trifosfato que no intercambian con el disolvente, tales como el  $^1\text{H}8$  de la base nitrogenada y los  $^1\text{H}1'$ ,  $2'$  y  $3'$  de la ribosa (Figura 46).

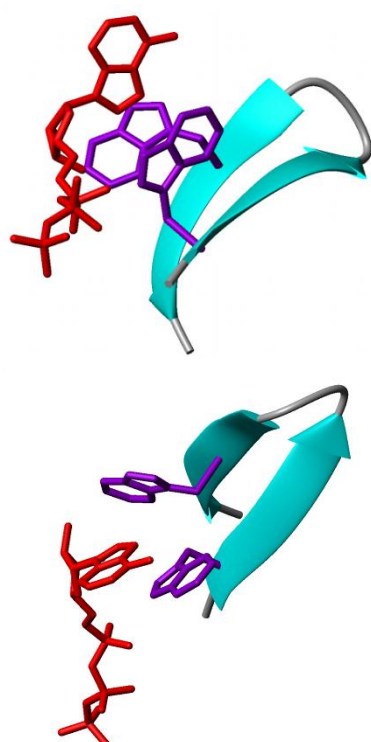


**Figura 46.** Rango de desplazamientos químicos de los espectros 2D NOESY (rojo) y TOCSY (azul) en el que se detectan las señales de los protones de los residuos aromáticos de las muestras de KIAβW, de forma aislada (izquierda) y en presencia de ATP (derecha). En ellos podemos observar tanto las resonancias debidas a la interacción entre los pares WW, como los diferentes NOEs existentes entre los  $^1\text{H}$  de la ribosa y alguno de los residuos del péptido, especialmente en el caso de las muestras con ATP, en cuyos espectros se detectaron hasta 31 NOEs intermoleculares entre los átomos de hidrógeno de la ribosa y los pertenecientes a los anillos indólicos de los triptófanos. Se hace evidente que la interacción entre los NTPs y el par WW provoca un desplazamiento de las señales de los residuos que forman puentes de hidrógeno, los cuales otorgan también estabilidad a la molécula. Los experimentos se llevaron a cabo con un  $\tau_m$  de 150 ms, a un pH de 6.4 y 5 °C, con una concentraciones de péptido y NTP de 6 y 12 mM respectivamente, en tampón H/NaAc 10 mM y con DSS 50  $\mu\text{M}$ .

Estos resultados se corroboraron después mediante análisis conformacionales de los desplazamientos químicos y modelos de dinámica molecular, calculados a partir de las listas de

asignaciones realizadas en los espectros de RMN. En los concerniente al análisis conformacional, similar al llevado a cabo para el péptido por separado (Figura 34), habría que destacar el hecho de que el perfil dibujado por la  $\Delta\delta^1\text{H}_\alpha$  para KIAβW se mantenía en el caso de las señales detectadas a partir de las muestras del péptido con ATP, es decir, que la estructura de horquilla β no se veía demasiado alterada por la interacción con el nucleótido. Según los modelos moleculares calculados, el ATP interaccionaría con el par WW de KIAβW estableciéndose las interacciones mencionadas con ambos Trp, sin modificarse demasiado la hebra β, pero causando una apertura en el apilamiento existente entre los fluoróforos (Figura 47). Esto provocaría, además, una pérdida en el alabeo existente entre las hebras, al igual que ocurre cuando agentes intercalantes como el EtBr interaccionan con las dobles hélices del DNA. El ángulo entre el primer puente de hidrógeno del esqueleto peptídico y el más cercano al giro es de unos  $73^\circ$  y el ángulo diedro formado por los planos de los residuos aromáticos de Trp pasa de  $157,98^\circ$  a  $113,87^\circ$ , lo que permite al anillo de adenina del ATP intercalarse entre el par WW, estableciéndose un apilamiento con uno de los Trp y una interacción de tipo “cara contra borde” con el otro.

**Figura 47.** Modelos de KIAβW con ATP calculados a partir de la asignación de un total de 309 NOEs, entre los que se observaron 172, 54 y 83 NOEs de corto, medio y largo alcance, respectivamente. A partir de las 20 estructuras con una función blanco más baja, se realizaron cálculos de refinamiento usando AMBER. Las cadenas laterales de los Trp del par WW están coloreados en morado y la molécula de ATP en rojo. En la tabla que hay bajo estas líneas se resumen los diferentes datos estadísticos extraídos del cálculo de la estructura y el análisis de interacciones intramoleculares, realizados del mismo modo que para el caso de la estructura del péptido sin ATP.



Restricciones de distancia	NOEs
Corto alcance, $(i-j) \geq 1$	172
Medio alcance, $(i-j) < 5$	54
Largo alcance, $(i-j) \geq 5$	83
<b>Total</b>	<b>309</b>

RMSD	(Å)
Esqueleto peptídico (N, Cα, C')	0,693
Todos los átomos pesados	0,841

Gráfico de Ramachandran*	%
Ángulos en las regiones más favorecidas	88,9
Ángulos en regiones permitidas	11,1
Ángulos en regiones adicionales	0
Ángulos en regiones no permitidas	0

\*Apéndice 8.

Asignaciones estereoespecíficas	13
Restricciones angulares ( $\Phi, \Psi$ )	16
Función blanco en CYANA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>+</sup>	0,30
Energía en AMBER ( $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) <sup>+</sup>	$-1111 \pm 18$
Violación máxima ( $\text{\AA}$ ) <sup>+</sup>	0,35
Nº de Violaciones $> 0,4 \text{\AA}$ <sup>+</sup>	0
Longitudes de enlace ( $\text{\AA}$ ) <sup>+</sup>	$0,0116 \pm 0,0004$
Ángulos de enlace ( $^\circ$ ) <sup>+</sup>	$3,3 \pm 0,2$

<sup>+</sup>Valores promedio de los 20 conformeros.

Interacciones intramoleculares
<b>Interacciones hidrófobas (<math>\leq 5 \text{\AA}</math>)</b>
Trp 2 - Trp 9
Ile 3 - Ile 10
Ile 3 - Ile 5
Ile 5 - Ile 10
<b>Enlaces de H en el esqueleto (NH-OC)</b>
Ile 3 - Ile 10
Ile 5 - Lys 8
Gly 7 - Ile 5
Lys 8 - Ile 5
Ile 10 - Ile 3
His 12 - His 1
<b>Entre residuos aromáticos (4,5 - 7 Å)</b>
Trp 2 - Trp 9
(Ángulo diedro = $113,87^\circ$ )
<b>Catión-<math>\pi</math> (<math>\leq 6 \text{\AA}</math>)</b>
Trp 9 - Lys 11 ( $110,75^\circ$ )

La cola de grupos fosfato, cargada de forma negativa, interaccionaría con los grupos amino de Lys 4 y Lys 11, cargados positivamente, cuyas cadenas laterales se alejarían de los Trp al haberse perdido las interacciones por apilamiento para permitir la entrada de la base nitrogenada. Aunque este tipo de interacciones es difícilmente identificable mediante los experimentos de RMN a causa de la falta de las señales correspondientes, sí son observables en cualquier tipo de experimento de “docking” automático que tenga en cuenta las interacciones electrostáticas que puedan producirse (Macindoe et al. 2010). Teniendo en cuenta el modo en el que el ATP se une al péptido KIA $\beta$ W, si consideramos similares para todos los nucleótidos tanto las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato, como las que se establecen entre los protones de la ribosa y las cadenas laterales de los Trp, lo que regiría principalmente los fenómenos de unión a los diferentes NTPs sería la mayor o menor internalización de las bases nitrogenadas entre los pares WW. Estas premisas podrían también explicar los fenómenos detectados en los experimentos de fluorescencia, teniendo en cuenta el apantallamiento provocado por la unión de los NTPs. El hecho de que las muestras con GTP y UTP presentasen un menor apantallamiento podría ser debido a que, de acuerdo con las estructuras obtenidas a partir de los  $\delta$  de los espectros de RMN, la unión no se producía de forma clara con ninguno de los residuos que actuaban como fluoróforos. De este modo, quedaban libres para seguir emitiendo fluorescencia, al contrario de lo que ocurre en el caso de las muestras con ATP y en menor orden con CTP, donde ambos Trp estar interaccionando con los nucleótidos sufriendo un apantallamiento mayor.



## **7. DISCVSIÓN GENERAL**





Hemos demostrado que pequeños péptidos putativamente prebióticos ricos en residuos de arginina son capaces de formar estructuras plegadas específicamente, con un motivo estructural tipo “haz de cuatro hélices” o “four-helix bundle”, en la que las cadenas laterales de los residuos menos polares se orientan hacia el centro dando lugar a un bolsillo hidrófobo, mientras las cadenas laterales de los aminoácidos cargados quedan expuestas al exterior. Al igual que los péptidos KIA7, este tipo de estructuras cumple con el patrón hidrófobo-hidrófilo que deberían tener las primeras moléculas complejas en un entorno abiótico (Brack and Orgel 1975; Longo and Blaber 2012). Además, los péptidos RIA7 poseen una estabilidad conformacional similar a la observada en péptidos KIA7 y dan lugar a agregados en presencia de RNAs, pero sin catalizar la degradación del modo en que lo hacen sus homólogos ricos en Lys.

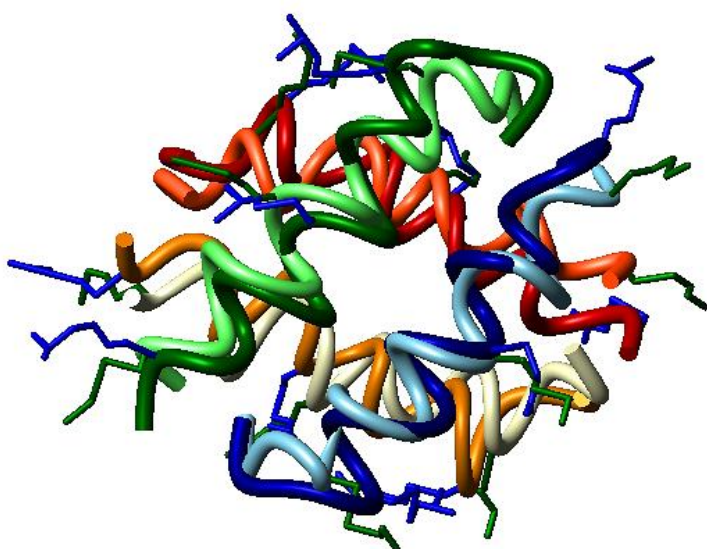
Las propiedades de estabilidad de los péptidos RIA7, a las concentraciones y presencia de sal definidas, son similares a las observadas para los péptidos KIA7, algo bastante sorprendente dado el parecido estructural de la cadena lateral de la Arg con el grupo guanidino de ciertos agentes desnaturizantes (Mason et al. 2004). La mayor distancia a la que se sitúan las cargas de la cadena lateral de la Arg, la deslocalización de estas o la capacidad de favorecer la estabilidad del núcleo hidrófobo de los tetrámeros captando las moléculas de agua del medio (Scott et al. 2008; Lim et al. 2009), pueden ser las causas de la estabilidad de estas estructuras tetraméricas helicoidales.

La sustitución de Lys por Arg en la secuencia de este tipo de péptidos no afecta significativamente a su estructura, como demuestran los bajos valores de RMSD entre las estructuras de RIA7 y KIA7: RMSD promedio de 1,45 Å para la estructura de cada una de las hélices por separado y un RMSD de 2,30 Å para el tetrámero completo (Subbiah et al. 1993; Krissinel and Henrick 2004; Velankar et al. 2012) (Figura 48). El escaso efecto estructural de estas modificaciones puede ser útil en el diseño de péptidos y proteínas donde se quiera alterar la funcionalidad sin afectar la estructura. Particularmente relevante sería el caso de proteínas de unión a membrana, donde este tipo de sustituciones tienen interés para favorecer la internalización de las mismas (Hong and Su 2011; Walrant et al. 2012).

Por otra parte, los resultados de los estudios de interacción de RIA7 con RNA indican que dicha interacción se produce con una estequiometría peculiar, de modo que las interacciones electrostáticas no son las únicas fuerzas que permiten la unión a RNA, sino que otro tipo de fuerzas están presentes participando en la formación de los complejos, como por ejemplo: interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals. Estos resultados sugieren que los residuos de Arg permiten formar una red de interacciones que estabiliza los complejos proteína-RNA. Esta observación podría ser trasladada a un punto de vista más evolutivo y, más

específicamente, serviría para apoyar la existencia de un “RNA-peptide World”, ya que la formación de estos complejos supondría la aparición de mecanismos evolutivos más eficientes.

Las secuencias de los péptidos KIA7 y RIA7, así como los métodos empleados durante el estudio de sus propiedades, pueden servir de ejemplo para ensayos de estabilidad e internalización celular de compuestos de importancia biomédica similares (Fuchs and Raines 2006; Okuyama et al. 2007; Ng et al. 2008; Sundlass and Raines 2011), dado que se ha demostrado que el intercambio de los residuos de Lys y Arg alteran la funcionalidad y capacidad de interacción de los péptidos, sin ello suponer grandes cambios conformacionales dentro de la estructura de los mismos y sin afectar apenas a su estabilidad.



**Figura 48.** Representación gráfica de la estructura de RIA7Y (PMDB ID: PM0077977) y la estructura de KIA7Y depositada en el PDB (2jo4). El alineamiento se realizó para la totalidad de los átomos del esqueleto (las cuatro hélices). Se obtuvo un valor de RMSD de 2,30 Å. Las hélices correspondientes al péptido RIA7, con Arg en azul, se muestran en colores oscuros, mientras que los monómeros de KIA7, con Lys en verde, se identifican con colores claros. Se puede apreciar que la disposición estructural apenas se encuentra modificada por la presencia de Arg en lugar de Lys.

Aunque se haya podido detrerminar la composición exacta de los agregados formados entre los péptidos RIA7 y los distintos RNAs, sí que se intentaron realizar espectros de las partículas precipitadas disolviendo las muestras en urea, pudiéndose averiguar la estequiometría de los agregados y observándose cierta estabilidad en ellos, aunque no fuese comparable con la que poseen ciertos amiloides. Un análisis espectral en profundidad de estos agregados requeriría la utilización de RMN de sólidos, una técnica que se alejaba de los objetivos de este proyecto, pero que sería interesante poner a prueba en futuros estudios.

Gracias al análisis estructural del péptido KIA7I, uno de los compuestos menos estables de la familia KIA7, constituido solo por cuatro aminoácidos prebióticos (Lys, Ile, Ala y Gly), hemos descubierto que es también capaz de adoptar estructuras tetraméricas helicoidales tipo “four helix bundle”, aunque con mayor variabilidad conformacional que sus homólogos con residuos aromáticos

C-terminales. La Ile carboxiterminal da lugar a cierta diversidad conformacional, por lo que concluimos que los compuestos aromáticos en dicha posición son necesarios para lograr un plegamiento específico en esta clase de proteínas sencillas. KIA7I se une a compuestos aromáticos y lo hace de forma preferente a aquellos de menor volumen molecular y una menor polaridad, si bien dichos compuestos no se unen únicamente al bolsillo ocupado por la cadena lateral de los residuos aromáticos en las variantes de KIA7 más estables.

Tras monitorizar la fluorescencia del ANS y observar el comportamiento de este péptido frente a moléculas como el DSS en presencia de benceno, se confirma que la unión al benceno perturba la estabilidad del núcleo estructural de KIA7I, pasando a adoptar una conformación de tipo glóbulo fundido. Estos ensayos dieron pie a realizar estudios sobre la generalidad del efecto del benceno en proteínas de diversa naturaleza conformacional. Como resultado, se puede afirmar que el benceno se une también a otros polipéptidos estructuralmente desordenados, tales como el péptido A $\beta$  del Alzheimer, pero no a proteínas específicamente plegadas y de mayor estabilidad estructural, como HEWL o KIA7W. Basándonos en estas observaciones, podemos decir que el benceno se une y perturba la estructura de proteínas parcialmente plegadas o con estructura desordenada. Un tercio de las proteínas de eucariotas contiene al menos un dominio desordenado bajo determinadas condiciones de pH o temperatura, si tiene lugar la unión con un ligando o cuando ocurre algún tipo de modificación química (fosforilación, glicosilación, etc.). A menudo, estas proteínas intervienen en procesos de regulación génica, señalización y desarrollo celular, por lo que los dominios desordenados o parcialmente desestructurados podrían estar estrechamente relacionados con enfermedades cancerosas (Dunker et al. 2001; Garza et al. 2009) y es que, al igual que las numerosas regiones desordenadas del RNA y DNA, muchas de las proteínas que interaccionan con ellos también poseen dominios igualmente desordenados (Dyson 2012). Se sabe que el benceno y otros compuestos aromáticos son nocivos para la salud humana. Estudios anteriores han demostrado que este efecto puede deberse a la capacidad de estos compuestos aromáticos para intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA y el RNA e inducir mutaciones en el marco de lectura y otros errores durante la traducción. Del mismo modo, ahora sabemos que el benceno también es capaz de unirse a proteínas moderadamente desplegadas y alterar así su estructura, al afectar al empaquetamiento de los núcleos hidrófobos, permitiendo su unión a otros ligandos o dando lugar a modificaciones químicas, lo que daría lugar a alteraciones en las interacciones proteína-proteína y podría incluso llegar a originar formas proteicas aberrantes desde el punto de vista fisiológico. En este último caso, la detección de regiones susceptibles de sufrir modificaciones por la interacción con este tipo de compuestos aromáticos sería fácilmente detectable mediante la fluorescencia del ANS mencionada en este trabajo, pudiéndose realizar incluso *in vivo* (Hadley et al. 2011).

La elucidación estructural y el análisis de interacción con NTPs en el caso de péptidos KIA $\beta$  nos permiten considerar una estructura de horquilla  $\beta$  como alternativa a los péptidos helicoidales como moléculas predominantes en un plausible escenario prebiótico junto con los RNAs, gracias a la sencillez de su estructura y sus propiedades de autoensamblaje e interacción con ácidos nucleicos. Ya se conoce la capacidad de algunas láminas  $\beta$  para formar lo que se conoce como amiloides, proteínas muy estables, capaces de soportar condiciones extremas de temperatura, acidez y degradación, gracias a interacciones de van der Waals, hidrófobas o por puente de hidrógeno. Un ejemplo de estas estructuras amiloides lo encontramos en los priones, moléculas capaces de autoensamblarse y favorecer la propagación de su propia conformación, alguna de cuyas variantes parece estar compuesta en su totalidad por aminoácidos plausiblemente prebióticos, por lo que algunos autores han llegado a proponer un mundo prebiótico con amiloides como origen (Maury 2009; Braun et al. 2012; Greenwald and Riek 2012). Láminas  $\beta$  con una estructura como la aquí estudiada, además de estar presentes en la formación de amiloides e incluso de los hidrogeles descubiertos recientemente (Rughani and Schneider 2008), tienen una presencia notable en proteínas globulares y a menudo son los dominios que promueven el plegamiento o agregación de las mismas (Blanco et al. 1994; Brutscher et al. 1997). También parecen desempeñar funciones esenciales en el inicio de la traducción (Hodel et al. 1997; Matsuo et al. 1997; Tomoo et al. 2002) o regulando patrones de transcripción (Halfmann et al. 2012) y por ello se consideraron durante este trabajo como estructuras perfectamente viables para la coexistencia de un mundo prebiótico junto a los ácidos nucleicos.

La especificidad por la unión preferente a ATP y, en menor medida a CTP, indica que los péptidos con conformación en horquilla  $\beta$  podrían haber tenido un papel como cofactor o como agente protector en las diferentes etapas de un posible mundo abiótico y las sucesivas etapas evolutivas posteriores, hasta la aparición de las protocélulas. La manera en la que KIA $\beta$ W interacciona con el ATP, de forma mucho más evidente que con el resto de NTPs, muestra la especificidad que pueden llegar a alcanzar moléculas tan simples, si se proponen la secuencias aminoacídicas apropiadas durante su diseño, en base a las propiedades de las diferentes combinaciones de residuos. Así, se ha demostrado que los pares WW son esenciales en la estabilidad de este tipo de moléculas y, al parecer, pueden considerarse también como un excelente microdominio de unión a ácidos nucleicos, llegando esta interacción a favorecer la estabilidad estructural de los péptidos. Nuestros resultados confirman que las estructuras en horquilla  $\beta$  no están solo estabilizadas por los puentes de hidrógeno formados entre átomos del esqueleto. Las interacciones de tipo catión- $\pi$  y los fenómenos de apilamiento entre las cadenas laterales de los residuos Trp y algunos residuos adyacentes también juegan un papel importante.

Somos conscientes de que alguno de los residuos que forman parte de los péptidos diseñados como presuntos compuestos prebióticos aún no han sido encontrados a una concentración relevante en los diferentes experimentos ideados hasta la fecha (Doi et al. 2005; Longo and Blaber 2012). Según esto, en condiciones abióticas, encontraríamos más probable la formación de estructuras peptídicas con conformación en hélice  $\alpha$  o la aparición de estructuras amiloides, que el surgimiento de horquillas  $\beta$  sencillas similares a las descritas, ya que estas precisan de residuos de Trp para adoptar una disposición estable. Aún con todo, si bien no estaríamos delimitando cronológicamente la aparición de estos residuos, lo que sí parece haber quedado demostrado es que, en especial Lys, Arg y Trp, son aminoácidos que parecen haber sido claves en la evolución bioquímica. Además, con el paso de los años, la cantidad de compuestos sintetizados en condiciones putativamente prebióticas, al igual que el número de propuestas para tratar de dar una explicación plausible del origen de la vida, han ido en aumento gracias a los avances científico-técnicos logrados. Es por ello que no es de extrañar que existan más opiniones que otorgan gran importancia a la formación de péptidos incluso antes de surgir el “RNA world” (Reiner et al. 2006; Rode et al. 2007). El papel de dichos residuos y péptidos en el origen de la vida en la Tierra es todavía una cuestión abierta a debate (Fishkis 2011; Danger et al. 2012), por lo que se hace patente que hoy en día este tipo de investigaciones despiertan un interés similar al que suscitaban hace más de 50 años. Por eso confiamos en que, en el futuro, el trabajo realizado aquí será de utilidad para desarrollar una teoría completa que explique las cuestiones planteadas por la abiogénesis.



## CONCLUSIONES

- 1- Los péptidos RIA7, diseñados con secuencias mayoritariamente compuestas por aminoácidos presuntamente prebióticos y ricos en Arg, presentan una estabilidad próxima a la de sus homólogos con Lys, a pesar de la similitud de la Arg con ciertos agentes desnaturalizantes. La sustitución de las Lys por Arg no entraña variaciones relevantes ni en la estructura, ni en la estabilidad de este tipo de péptidos.
- 2- Los péptidos RIA7 son capaces de adoptar estructuras helicoidales tetraméricas con una conformación en haz de cuatro hélices dispuestas dos a dos formando una X, enfrentadas de forma antiparalela en cada par.
- 3- Los péptidos RIA7 interaccionan con ssRNAs favoreciendo un correcto plegamiento de los mismos e incluso dando lugar a la formación de agregados compuestos por complejos RNA-péptido.
- 4- KIA7I, un péptido compuesto en su totalidad por aminoácidos putativamente prebióticos, según los mecanismos descritos hasta la fecha, posee un extremo carboxiterminal desordenado capaz de adoptar varias conformaciones en las que se establecen distintos puentes de hidrógeno entre la Ile terminal y los residuos adyacentes. La sustitución de los residuos aromáticos C-terminales por Ile ha corroborado la importancia estructural de los mismos para que este tipo de péptidos adopten una conformación única y completamente plegada, ya que las Ile no se adaptan de manera tan eficaz al núcleo hidrófobo formado en el tetrámero helicoidal.
- 5- Los análisis de interacción entre péptidos KIA7I y compuestos aromáticos sencillos revelaron que los arenos no se unen únicamente al núcleo hidrófobo de los haces tetraméricos formados por las hélices. La estructura de los péptidos KIA7I no se ve alterada por la interacción con arenos y mantiene zonas accesibles a la unión con otros ligandos.  
El benceno, el areno más simple y menos polar, presenta una especial disposición hacia la interacción con compuestos peptídicos con estructuras menos estables y se une de forma específica a dominios con conformaciones de tipo glóbulo fundido. Esta observación es especialmente relevante, dado el carácter nocivo de este tipo de compuestos y la abundancia de dominios intrínsecamente desordenados en las proteínas celulares.
- 6- El péptido KIA $\beta$ W, compuesto por 12 aminoácidos, es capaz de adoptar una estructura en horquilla  $\beta$  específicamente plegada, con hebras de cinco residuos conectadas de forma antiparalela a través de un giro de tipo I'. La presencia del par WW es crucial para la formación de estructuras estables, mientras que compuestos con residuos de Phe o His, ocupando la misma posición, dan lugar a conformaciones desplegadas.  
Dado que aún no se conoce una ruta de síntesis prebiótica viable para la formación del Trp, este resultado indicaría la no existencia de este tipo de horquillas  $\beta$  en un mundo primigenio.



- 7- El análisis conformacional de KIA $\beta$ W muestra diversos tipos de interacciones que favorecerían la estabilidad estructural de la horquilla  $\beta$ : puentes de hidrógeno entre grupos carbonilo y amino de los enlaces amida del esqueleto peptídico, interacciones electrostáticas entre los átomos de las cadenas laterales de residuos que se encuentran próximos entre sí e interacciones debidas a fenómenos de apilamiento entre los Trp del par WW, estableciéndose también interacciones de tipo catión- $\pi$  con algunos de los aminoácidos cercanos.
- 8- Se ha demostrado que los péptidos KIA $\beta$ W son capaces de unirse a ribonucleótidos trifosfato, observándose una mayor interacción sobre todo con ATP y, de forma más sutil, con CTP, intercalándose entre el par WW situado en la superficie de las horquillas  $\beta$ .

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 8.1. Síntesis de RNAs

Para la obtención de los RNAs empleados durante los diferentes ensayos de actividad y pruebas de interacción con los péptidos estudiados se optimizó un procedimiento de síntesis mediante transcripción *in vitro* haciendo uso de la polimerasa del fago T7 (EC: 2.7.7.6.).

### 8.1.1. Síntesis de la polimerasa del fago T7

La RNA polimerasa del fago T7 (T7 RNAP) (Moffatt et al. 1984) es capaz de catalizar los procesos de inicio, elongación y terminación de la transcripción de todo el DNA vírico, sintetizando las cadenas de RNA en dirección 5'→3', mientras que el enzima del huésped es inactivado. T7 RNAP se une, de forma específica, únicamente a los promotores de DNA vírico y, al contrario que otras RNA polimerasas dependientes de DNA, no es una enzima multisubunitaria y su mecanismo de transcripción es mucho más simple, ya que no precisa de primers para comenzar la transcripción. Reconoce el DNA molde y cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre el primer par de NTPs, con especificidad por el GTP como nucleótido inicial (Cheetham and Steitz 1999; Kennedy et al. 2007). La  $K_D$  de este primer dinucleótido es de 2 mM, de 80  $\mu$ M la del segundo y de 5  $\mu$ M para el resto de NTPs unidos durante la fase de elongación (Bandwar et al. 2002; Anand and Patel 2006). Estas características hacen del fago T7 un excelente modelo de estudio de las diferentes etapas de la transcripción dependiente de DNA, y de la T7 RNAP una herramienta idónea para la síntesis *in vitro* de RNA.

Para su obtención *in vitro*, la secuencia completa del gen codificante de la T7 RNAP ha sido introducida en el plásmido de sobreexpresión pAR1219, cuya expresión está sujeta a la regulación ejercida a través del promotor lac UV5 y un gen codificante del represor lac, denominado lacI, pudiéndose inducir la expresión con IPTG. Este compuesto es capaz de unirse a lacI, dejando libre la región operadora y permitiendo que la RNAP se una al promotor lac UV5 para dar comienzo a la transcripción, que no se detendrá, al no ser el IPTG metabolizado por la bacteria. Debido a que la T7 RNAP podría ser degradada por la proteasa OmpT, usamos una cepa de *E. coli* que además de poseer el plásmido que contiene el gen de la RNA polimerasa es también deficiente en las proteasas Lon y OmpT: BL21/pAR1219, denominado también pT7-911 (Davanloo et al. 1984; Grodberg and Dunn 1988; Zawadzki and Gross 1991; Vinayak et al. 1995; Li et al. 1999; Karberg et al. 2001).

El primer paso de la síntesis es sembrar una placa de LB + Amp con la cepa pT7-911. Se dejan crecer las bacterias durante toda la noche a temperatura ambiente o durante unas horas a 37 °C

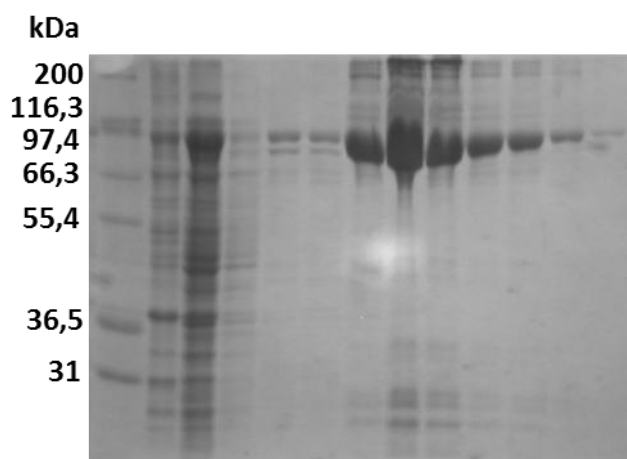
(Cooper and Helmstetter 1968; Kubitschek and Freedman 1971). Después se prepara un preinóculo de 80 mL en un matraz con LB + Amp en medio líquido, usando una de las colonias de la placa, incubándolo a 37 °C en agitación durante 24 horas. Para la preparación de 1 L del medio de cultivo líquido de LB + Amp se usaron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levaduras, 10 g de NaCl y 1 mL de ampicilina (100 mg/mL), la cual se añade justo antes de inocular las células. Al día siguiente, en 4 matraces con 250 mL de LB + Amp se añadieron 12 mL de preinóculo por recipiente y se dejaron a 37 °C, en agitación, mientras se monitoriza la replicación celular tomando alícuotas cada cierto tiempo y midiendo su densidad óptica alrededor de los 600 nm empleando un espectrofotómetro portátil (Toennies and Gallant 1949; Bradford 1976). Cuando la OD<sub>600 nm</sub> es de 0,6 ( $\approx$  45 min), las células han alcanzado su punto álgido de replicación. Es entonces cuando se procede a inducir la transcripción del plásmido añadiendo 250  $\mu$ L de IPTG 0,5 M por matraz, manteniendo la agitación 1 h más a 37 °C. De forma paralela, 0,5 mL de preinóculo en 10 mL de LB + Amp, sin inducir la transcripción con IPTG, sirven para tener un control negativo con el que comparar los resultados obtenidos y comprobar posibles fenómenos de contaminación. Transcurrida una hora se recoge el pellet centrifugando los inóculos 10 min a 6000 rpm y 4 °C, desechando el sobrenadante y calculando después la cantidad de células obtenidas en cada caso. Para llevar a cabo el lisado de las bacterias, se prepararon las siguientes soluciones:

	<b><u>A (Binding Buffer)</u></b>	<b><u>B (Washing Buffer)</u></b>	<b><u>C (Elution Buffer)</u></b>
<b>KPi pH8 1M</b>	25 mM	25 mM	25 mM
<b>NaCl 5M</b>	300 mM	300 mM	300 mM
<b>Imidazol pH8 1,5M</b>	10 mM	20 mM	300 mM
<b>PMSF 99%</b>	20 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
<b>Beta mercaptoetanol*</b>	0,1%	0,1%	0,1%

\* Para anular el efecto de posibles ribonucleasas liberadas durante la lisis celular se eligió este compuesto en lugar del DTT, porque su menor poder reductor sería más conveniente durante la elución en las columnas de Ni.

Las etapas del lisado celular se llevan a cabo a baja temperatura, para evitar en la medida de lo posible la desnaturalización proteica. Para realizar el lisado se empleó una prensa de French, resuspendiendo inicialmente las inducciones añadiendo 1 mL de disolución A por cada 0,1 g de pellet resultante. Una vez obtenido el lisado, antes de hacerlo pasar por la columna, se centrifugó durante 30 min a 11000 rpm, tomando esta vez el sobrenadante resultante y almacenando una alícuota de 20  $\mu$ L, proceso que repetimos en cada una de las etapas de la purificación para el posterior análisis de los resultados mediante SDS-PAGE. Para evitar obstrucciones en el circuito de la cromatografía de afinidad, la fracción soluble se filtró empleando filtros de 0,45  $\mu$ m. Después de hacer pasar unos 50-100  $\mu$ L de agua mili-Q por el circuito, se hicieron circular 50-100  $\mu$ L de

disolución C con un flujo máximo de 2 mL/min, antes de conectar una columna de Ni de 5 mL, evitando la formación de burbujas de aire a su través. Primero se hacen pasar 20-30 mL de tampón C, después 20-30 mL de tampón A y finalmente el sobrenadante resultante de la lisis celular, recogiendo sobre hielo la elución a partir de los 5 mL, para evitar perder proteína en caso de que se sature la columna. La T7 RNAP presente en las muestras queda adherida a los cationes de la columna, especialmente por la afinidad con alguna de sus 22 His. Tras lavar el circuito y la columna, primero con 20-25 mL de disolución A y después con 15 mL de disolución B, se usa disolución C para eluir la proteína, tomando 7 fracciones de 2 mL al comienzo de la elución y, después, 10-15 mL del resto para no desechar nada si quedase algo de proteína en la columna. Con el fin de corroborar que las diferentes etapas del proceso de purificación se han llevado a cabo de manera correcta, se emplea un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturizantes, tal y como se explicará más adelante en el apartado 8.2.1 (Figura 49).



**Figura 49.** Gel resultante de la SDS-PAGE al 12,5% realizada, en condiciones desnaturizantes, durante la primera purificación de una de las síntesis de T7 RNAP que se llevaron a cabo durante este proyecto. De izquierda a derecha, las alícuotas correspondientes a las diferentes etapas que componían el proceso de purificación: marcador de tamaño comercial MK12; sobrenadante obtenido durante la lisis celular; primera elución tras hacer circular el lisado; lavado con disolución A; lavado con disolución B; fracciones de 2 mL (1-7) y lavado con disolución C. En caso de detectarse una cantidad considerable de proteína en la elución del sobrenadante del lisado por primera vez, como es el caso, significa que la columna ha quedado saturada por la gran cantidad de proteína generada. Se optó entonces por realizar una segunda purificación con la fracción recogida en esa etapa.

Tras reconocer las fracciones que contenían una mayor proporción de la T7 RNAP, se llevó a cabo una primera diálisis durante 24 horas a 4° C, en agitación y empleando membranas de diálisis con un tamaño de poro de 6-8 kDa, en un buffer de diálisis compuesto por NaPi 20 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Glicerol 5% y NaCl 10 mM. Al día siguiente, se recogió el resultado de la primera diálisis, se centrifugó la muestra 5 min a 5125 rpm y se desechó el sobrenadante. Tras resuspender el pellet, en 10 mL de un tampón similar al empleado anteriormente pero con una concentración final de NaCl 100 mM, se dializó la proteína por segunda vez en las mismas condiciones, se centrifugó la muestra resultante 15 min a 7000 rpm y se recogió el sobrenadante. Tomando alícuotas durante ambas diálisis, mediante una SDS-PAGE al 12,5% con diluciones de las

mismas, se pudo comprobar que la purificación de la T7 RNAP había sido realizada con éxito. Para el cálculo de la concentración y el alicuotado del enzima, se tuvo en cuenta un peso molecular para la T7 RNAP de  $100000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y un  $\epsilon_{280\text{nm}}$  de  $140000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Se midieron el volumen total de muestra y su absorbancia a 280 nm (empleando como blanco el mismo tampón usado durante la segunda diálisis) para poder calcular la cantidad de proteína sintetizada. El enzima se almacenó a  $-20^\circ \text{C}$ , en alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  preparadas a una concentración de 1 mg/mL, empleando un tampón de dilución compuesto por: KPi 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 mM, DTT 5 mM, glicerol 50% y KCl 200 mM.

### 8.1.2. Síntesis de RNAs mediante transcripción *in vitro*

Inicialmente, la T7 RNAP reconoce las secuencias de dsDNA molde a través de la región que contiene el promotor del enzima. Al principio, el enzima sufre una serie de procesos abortivos en los que sintetiza, de forma repetitiva, pequeños fragmentos de RNA que libera al medio hasta que los transcritos comienzan a adquirir una mayor longitud. Entonces, el complejo de elongación sufre un cambio conformacional, adopta una conformación más estable, conocida como burbuja de transcripción, y la T7 RNAP entra en una fase de procesividad que finalizará al encontrar una señal de terminación o al liberarse del molde (Yin and Steitz 2002; Steitz 2009). Para que el enzima lleve a cabo su función necesitamos un DNA molde con la secuencia promotor reconocida por la T7 RNAP (5' TAATA CGACT CACTA TAG 3'), unida a su secuencia complementaria (5' CTATA GTGAG TCGTA TTA 3'), la cual habrá que añadir a la secuencia de DNA diseñada para la obtención del RNA monocatenario deseado. Además, en el medio de transcripción, se necesita  $\text{Mg}^{2+}$  y NTPs para dar lugar al RNA que se pretende obtener.

Antes de llevar a cabo la síntesis se tomaron las precauciones necesarias para evitar la degradación de los RNAs resultantes, incluida la limpieza de la poyata y el material de laboratorio con una solución comercial, RNaseZap, para eliminar posibles trazas de RNasas. Tras la optimización del proceso de síntesis *in vitro* de los RNAs usados durante este proyecto ( $\tau 10$ : 5' GACGT GTGAA GGTAC TCACA CTGCC TATAG TGAGT CGTAT TA 3' y (AUUCU)<sub>9</sub>: 5' AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT AGAAT CTATA GTGAG TCGTA TTA 3'), el protocolo comienza con la hibridación entre las secuencias de DNA del promotor de T7 RNAP y la diseñada para la transcripción de cada RNA. Para ello, se realizó la

mezcla de ambos ácidos nucleicos en igualdad de concentraciones (10  $\mu$ M) y se calentó 5 min a 90° C, para después dejar que se enfriase lentamente a 37° C durante unas horas y conseguir una región de dsDNA con el promotor que, dada su alta especificidad, será reconocida por el enzima para transcribir la secuencia ssDNA situada a continuación.

Puesto que la concentración de  $Mg^{2+}$  es determinante para obtener buenos resultados durante la transcripción, una vez conocidas las condiciones óptimas de reacción, se procedió a realizar el ensayo de transcripción *in vitro* empleando  $MgCl_2$  20 - 45 mM (dependiendo del plegamiento de cada RNA), buffer de transcripción 1x (TB 5x: Tris HCl 200 mM pH 8, DTT 25 mM, tetraclorhidrato de espermina 5 mM, NaCl 25 mM, Tritón X-100 0,05% y PEG 400 mg/mL, en agua libre de RNasas), NTPs 4 mM, DNA 500  $\mu$ M, inhibidor de RNasas 32 U/mL y T7 RNAP 300 nM, hasta un volumen final de 10 mL por transcripción. La reacción se lleva a cabo a 37° C durante 4 horas y pasado este tiempo se detiene, añadiendo EDTA 40 - 90 mM (una concentración 2 veces superior a la empleada para  $MgCl_2$ ) y NaAc 10%, y precipitando el resultado con 25 mL de EtOH 100%. Previamente se tomó una alícuota para comprobar, usando urea-PAGE al 20%, que la transcripción había transcurrido de forma correcta y tras detener el proceso se dejó precipitar la muestra durante toda la noche a 4 °C.

El RNA resultante se purifica mediante geles desnaturalizantes de urea-PAGE al 20%, utilizando cubetas de electroforesis EV500 y preparando geles los suficientemente grandes como para poder cargar el producto obtenido durante las transcripciones de 10 mL. Para cargar el RNA en los geles, previamente se centrifugan las muestras que se habían dejado precipitando el día anterior, durante 10 min a 10000 rpm y 4° C, retirándose el sobrenadante; se resuspende el precipitado en 15 mL de EtOH 70%, se vuelve a centrifugar la muestra a 10000 rpm, durante 10 min y a 4° C, retirando de nuevo el sobrenadante y, finalmente, se resuspende el precipitado en 500  $\mu$ L de urea como máximo, junto con 200  $\mu$ L de la mezcla de BPB y xileno cianol usada para el seguimiento del RNA a través del gel. Después de correr las muestras en el gel a 400 - 600 V hasta la distancia deseada, observándose la emisión de luz por parte de los ácidos nucleicos a una  $\lambda \approx 460$  nm, al ser excitados con una lámpara UV a 365 nm, se disecciona la banda del gel que contiene el RNA purificado.

Para eluirlo de la matriz del gel, se corta en fragmentos de menor tamaño que son introducidos en un sistema Elutrap con el que obtenemos el RNA transcrito en disolución, controlando su presencia durante el proceso mediante espectrofotometría a 260 nm. Juntando todas las muestras resultantes, se mide el volumen total obtenido y se añade NaAc 10% y EtOH 100%, este último en una proporción tres veces superior al volumen obtenido. Tras centrifugar la preparación durante 10 min a 10000 rpm y 4° C, desechamos el sobrenadante y redisolvimos el precipitado en



1 mL de agua libre de RNasas, para proceder después a realizar la diálisis del RNA, empleando membranas con un tamaño de poro de 2 kDa. Al igual que se hizo durante el proceso de síntesis de la T7 RNAP, se toman alícuotas para monitorizar la presencia del RNA a lo largo de toda la purificación. Tras el proceso de diálisis, se liofilizaron las muestras de los diferentes RNAs sintetizados *in vitro* y se almacenaron a -20° C para su posterior uso durante los diferentes ensayos descritos en este trabajo. En ellos se tuvo en cuenta que, dado que el primer dinucleótido formado durante la reacción de transcripción por parte de la T7 RNAP mantiene los tres grupos fosfato del NTP añadido inicialmente, a la carga de los RNAs sintetizados enzimáticamente habría que sumarle 2 cargas negativas extra.

## 8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Puesto que las biomoléculas poseen una carga neta, estas se verán afectadas por la presencia de un campo eléctrico. Esta es la premisa por la que la electroforesis en gel se ha convertido en una técnica fundamental para la bioquímica y biología moleculares, permitiendo diferenciar, separar y cuantificar compuestos biológicos dependiendo de su carga, tamaño y pI, en función del campo eléctrico aplicado y el tamaño de poro de la matriz que compone los polímeros que forman los geles en los que se internan las moléculas (Kohlrausch 1897; Raymond and Weintraub 1959; Raymond et al. 1962; Davis 1964; Ornstein 1964). Más adelante, haciendo hincapié en el uso de los geles de poliacrilamida dirigidos a ensayos con proteínas de entre 5 y 2000 kDa y ácidos nucleicos con menos de 1 kbp, según su tamaño de poro uniforme, detallaremos los dos tipos de electroforesis en gel que podemos considerar si tenemos en cuenta la composición de los geles de poliacrilamida y los tampones que llenarán la cubeta de electroforesis.

Los ácidos nucleicos, cargados negativamente, migrarán hacia el electrodo positivo, donde tiene lugar un proceso de oxidación, mientras que los péptidos y proteínas, usualmente cargados de forma positiva a excepción de alguna molécula con un bajo pI, se desplazarán hacia el electrodo negativo, donde se da la reducción. Por una parte, DNA y RNA se desplazarán de forma diferente, siendo la velocidad de migración de moléculas bicatenarias inversamente proporcional a su tamaño. Por otra parte, el cDNA como los plásmidos da lugar a bandas múltiples y las hebras monocatenarias adoptan plegamientos más complejos, por lo que tendrán recorridos más complicados a lo largo del gel (Brody and Kern 2004).

En el caso de los péptidos y proteínas, la electroforesis en gel es de gran utilidad a la hora de conocer el peso molecular de dichos compuestos, diferenciarlos según sus estructuras o carga, así como también conocer el número de subunidades que los componen o la pureza con la que se ha logrado purificarlos. Por lo tanto, gracias a estas propiedades y al hecho de que se trata de un método sencillo y altamente reproducible, PAGE ha sido una técnica indispensable para el desarrollo de este proyecto, teniendo una especial precaución a la hora de manipular la acrilamida por sus propiedades neurotóxicas y cancerígenas.

Dejando a un lado la electroforesis bidimensional empleada para la separación de mezclas de proteínas, entre los ensayos de PAGE más empleados podríamos destacar principalmente dos tipos de condiciones experimentales: desnaturalizantes y en estado nativo.

### 8.2.1. PAGE en condiciones desnaturalizantes

Para facilitar el seguimiento durante el desplazamiento en el gel de moléculas con un plegamiento más complejo, se recurre a compuestos desnaturalizantes tales como el dodecilsulfato sódico o la urea, con el fin de obtener las formas desplegadas de las mismas y que la velocidad de migración dependa exclusivamente del tamaño de los compuestos y no de la conformación que adopten (Weber and Osborn 1969). El SDS podría promover la formación de estructuras no nativas con conformación en hélice  $\alpha$ , por lo que, a excepción de los geles contruidos para monitorizar la purificación de la T7 RNAP, se prefirió la urea como agente desnaturalizante.

Durante la síntesis y purificación del enzima empleada en los ensayos de transcripción *in vitro* se recurrió a geles de SDS-PAGE para monitorizar la presencia de la proteína, cuya construcción siguió el sistema de los dos geles: un gel de separación por el que migrarían las muestras y, sobre él, un gel de concentración para que todas ellas comiencen a difundirse en el gel al mismo tiempo (Laemmli 1970). El gel de separación está compuesto por una mezcla al 12,5% de acrilamida/Bis 29:1, Tris HCl 250 mM pH 8.8, SDS al 1%, APS al 1% y TEMED al 0,1%, estos dos últimos compuestos añadidos al final para catalizar la polimerización de los geles. Para el gel de concentración se realizó una mezcla similar pero con acrilamida/Bis 29:1 al 5%. Antes de la polimerización del gel de carrera, se añade algo de isopropanol para lograr una interfase uniforme y prevenir que el oxígeno impida la formación del gel, retirándolo antes de añadir la mezcla de concentración. Se añaden 2 - 5  $\mu$ L de muestra junto con unos 5  $\mu$ L de tampón de carga (una disolución acuosa de glicerol 10%, Tris HCl 25 mM pH 6.8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, BPB

0,005% y xileno cianol 0,005%), calentando las muestras a 90° C durante 5 min. Si fuese necesario, este tipo de técnica puede variarse según el tamaño de los compuestos que se deseen detectar o separar, de forma que modificando la composición de los geles y los tampones usados durante la electroforesis se puede lograr una separación efectiva de proteínas de entre 1 y 100 Da, como ocurre por ejemplo en el caso de los geles de tricina-SDS-PAGE, en los que la mayor carga y fuerza iónica de la tricina permitirán una migración de las proteínas más eficaz (Schagger 2006; Simpson 2006; Haider et al. 2012). En cuanto al tampón de electroforesis, se empleó un buffer compuesto por Tris base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0,1% para llenar la cubeta del montaje, que se conectó a unos 35 mA.

Para preparar los geles de urea-PAGE en condiciones desnaturalizantes, se usaron geles a diferente concentración dependiendo de las propiedades de las moléculas analizadas, de modo que un gel de urea-PAGE al 10% contiene: acrilamida/bis 29:1 al 10%, urea 7M, TBE 10x pH 8.2 (solución acuosa de Tris base 0,9 M pH 8.2, ácido bórico 0,9 M y EDTA 10 mM), APS 1% y TEMED al 0,1%. Se cargaron entre 0,5 - 4 µL de las mezclas de reacción preparadas, junto con 5 - 8 µL de urea 7 M y 2 µL de tampón de carga (BPB 0,005%, xileno cianol 0,005% y urea 7M), calentándolas 5 min a 90° C justo antes de depositarlas en los pocillos del gel. Como tampón de electroforesis se empleó TBE 1x y la fuente de alimentación se conectó aproximadamente a 35 mA.

### 8.2.2. PAGE no desnaturalizante

En el caso de los experimentos de interacción entre péptidos y RNAs llevados a cabo durante este proyecto, al querer realizar mediante PAGE un análisis de movilidad de los complejos, pero sin correr el riesgo de que ocurriese algún tipo de alteración en las estructuras de los mismos, se realizaron una serie de experimentos de electroforesis en gel, en condiciones nativas, sin ningún agente desnaturalizante que pudiese afectar a las muestras (Kleist 1972; Garner and Revzin 1981). El protocolo seguido para la preparación de los geles es similar al llevado a cabo durante la obtención de los geles de urea-PAGE, salvo que en lugar de emplear el tampón TBE se usó TBM (TBM 10x: Tris base 0,9 M, pH 8.4, ácido bórico 0,9 M, MgCl<sub>2</sub> 30 mM) para la preparación tanto de los polímeros como del buffer de electroforesis se prescindió de la urea. Los cationes divalentes presentes en el tampón ayudarán a que los RNAs adopten un plegamiento óptimo y facilitarán su migración (Koculi et al. 2007) a través de los geles que, en estas condiciones nativas, se prepararon

con acrilamida/bis 19:1 por ser más aconsejable para la detección de compuestos que se encuentren a baja concentración. La PAGE en estado nativo realizada en montajes horizontales se propuso, siguiendo el mismo procedimiento, teniendo en cuenta la diferencia del grosor en los geles y sin realizar un calentamiento previo de las muestras que pudiese llegar a provocar su desplegamiento.

### 8.2.3. Métodos de Tinción

En lo que respecta a los métodos de revelado, teniendo en cuenta el tipo de análisis que se quiera realizar, el tamaño y la concentración de los compuestos cargados en el gel, podremos elegir entre un amplio abanico de métodos de tinción o revelado. En el presente trabajo se emplearon métodos de tinción con azul de Coomassie o tinción con plata para el caso de las proteínas, y un revelado con azul de toluidina para monitorizar la presencia de los RNAs. En ambos casos también se recurrió a la tinción con Stains-All, un tinte comercial capaz de teñir el DNA de azul, el RNA de púrpura y las proteínas de carácter ácido de rojo, cuya acción puede complementarse con el resto de procesos de tinción.

Durante el revelado con azul de Coomassie, con una sensibilidad en la detección de unos 100 ng de compuesto, los geles adquieren una tonalidad azul a un pH superior a 2 en el caso del tinte usado: azul brillante de Coomassie R-250 (Meyer and Lamberts 1965). La forma G-250, con dos grupos metilos adicionales, es empleada mayormente en los ensayos de PAGE azul en condiciones nativas gracias a que aporta una carga neta negativa para todas las proteínas a las que se une (Wittig et al. 2010).

De forma alternativa, tal y como se detalla en este trabajo, se puede llevar a cabo un revelado con plata de forma aislada o realizando una tinción doble que permita detectar proteínas que no han podido visualizarse con el azul de Coomassie, al poseer este método una sensibilidad hasta 100 veces superior (Kerenyi and Gallyas 1973; Blum et al. 1987; Chevallet et al. 2006). Este procedimiento es muy empleado en análisis de esta clase debido a su gran sencillez: los iones de plata (sulfatos o nitratos) se unen a las proteínas y ácidos nucleicos para después, al reducirse, dar lugar a un color marrón amarillento característico, denotando la presencia del compuesto al que se unen. Los resultados obtenidos durante los experimentos de movilidad a través de geles en estado nativo de los complejos péptido-RNA fueron negativos, probablemente a causa del grosor de los geles horizontales sobre los que se aplicó este método, ya que el rango de concentraciones tanto de los

péptidos como de los RNAs presentes en el gel (3-20  $\mu\text{M}$ ) era más que suficiente para haber podido apreciar alguna señal de utilidad cualitativa.

Durante los experimentos con RNAs, el azul de toluidina, muy empleado en medicina e histología, fue el compuesto elegido para la tinción de los geles construidos. Durante el revelado, al tratarse de un compuesto catiónico básico, es capaz de unirse predominantemente a compuestos ácidos cargados negativamente (Bolt and Zerlett 1958; Popa and Bosch 1969; Chieco et al. 1993; Erkilic and Bayram 2009). A pesar de la sencillez del procedimiento, por este último proceso de lavado que puede ser demasiado laborioso si se realiza de forma manual, fue preferible el uso de Stains-All.

Como se ha mencionado anteriormente, el Stains-All es un compuesto comercial que permite teñir DNA, RNA y proteínas de carácter ácido con diferentes tonalidades, aunque la tinción de compuestos poco ácidos desaparece rápidamente con la exposición a la luz (Dahlberg et al. 1969; Goldberg and Warner 1997). De nuevo, este compuesto tampoco permitió detectar la fase peptídica de los complejos cargados en los geles horizontales de PAGE en condiciones nativas, probablemente a causa del carácter catiónico de los mismos (Sharma et al. 1989).

### 8.3. Dicroísmo circular (CD)

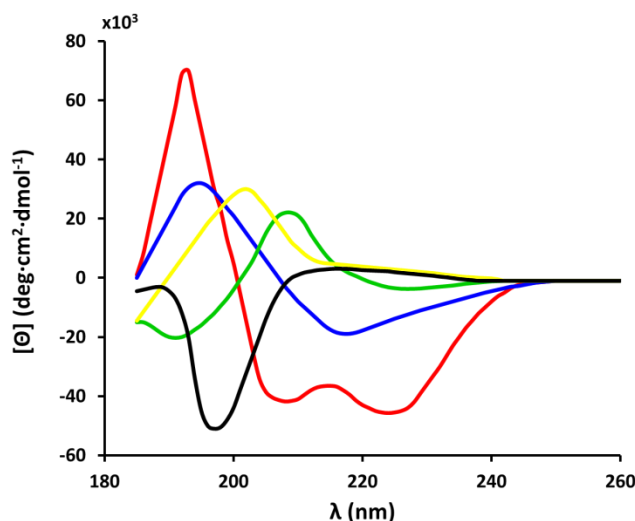
La espectroscopia de UV-CD se fundamenta en la propiedad que tienen las moléculas quirales para absorber de manera diferente la luz circularmente polarizada. Esta diferencia en la absorción resulta en una rotación del plano de polarización que, junto a la dispersión rotatoria óptica causada por los distintos índices de refracción, provoca una elipticidad ( $\Theta$ ) en el haz de luz polarizada que es el ángulo de la tangente entre el eje menor y mayor de la elipse formada. Así, según la ley de Lambert-Beer:  $\Delta\text{Abs}(\lambda) = A_I(\lambda) - A_D(\lambda) = [\epsilon_I(\lambda) - \epsilon_D(\lambda)] \cdot l \cdot c = \Delta\epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c$ , siendo  $A$  y  $\epsilon$  la absorbancia y el coeficiente de extinción molar para cada una de las polarizaciones circulares a una determinada longitud de onda,  $l$  el paso de luz y  $c$  la concentración de la muestra.

Los resultados observados en los espectros de CD suelen expresarse como elipticidad molar, ( $[\Theta] = 3298 \Delta\text{Abs}$ ), en valores de  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Para detectarla se emplea un espectropolarímetro que cuenta fundamentalmente con: una lámpara de Xe y unos monocromadores para generar la fuente de luz linealmente polarizada inmóvil; un conjunto de prismas y espejos para dirigir el haz hacia la muestra evitando la pérdida de intensidad y la formación de ruido; un modulador

fotoelástico (generalmente un cristal de ZnSe) que se comprime y expande al aplicar una frecuencia de oscilación de 50 kHz para generar los haces de luz circularmente polarizada a derecha e izquierda respectivamente, desfasados  $\pi/2$  al atravesarlo; una celda con la muestra sobre la que incidirán los haces de luz y un fotomultiplicador que actuará como detector para recoger la radiación resultante (Kelly et al. 2005). En nuestro caso, durante los experimentos de CD se emplearon un espectropolarímetro JASCO J-810, dotado de un dispositivo Peltier para el control de la temperatura, así como unas cubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 mm.

En el caso de los péptidos, son los átomos de los grupos amida que componen el esqueleto peptídico los que más interaccionan con el haz de luz polarizado (N, C y O actúan como cromóforos) y a causa de la deslocalización que sufren sus electrones encontramos transiciones de energía entre los diferentes orbitales  $\pi$ . También habrá que tener en cuenta la influencia de las cadenas laterales de Tyr, Phe y Trp, los fluorocromos más importantes a considerar, a la hora de realizar medidas en la zona del espectro de luz visible (Hirst 1998; Woody and Koslowski 2002). En el caso de los ácidos nucleicos, los espectros representativos, tanto de RNA como de DNA, muestran diferencias dependiendo del número de hebras que los formen y del tipo de empaquetamiento que presenten, teniendo en común unas señales negativas a 205 y 220 nm aproximadamente y una positiva a  $\lambda \approx 270$  nm (Kypr et al. 2009).

Determinados ordenamientos espaciales de aminoácidos poseen espectros de dicroísmo circular característicos, tal y como hemos podido observar a lo largo de los experimentos realizados (Figura 50). Así, encontramos que estructuras de ovillo estadístico poseen un valor de elipticidad ligeramente positivo a 230 nm debido a la transición  $n-\pi^*$  (transición rotacional que crea un momento dipolar magnético debido a un desplazamiento circular de la carga) y en los que se detecta una gran transición  $\pi-\pi^*$  (momento dipolar eléctrico, a causa del desplazamiento lineal de la carga) de signo negativo a 195 nm; las conformaciones en hélice  $\alpha$  muestran espectros de CD con valores negativos para la transición  $n-\pi^*$  a 222 nm y para  $\pi-\pi^*$  a 208 nm, encontrándose esta última dividida a causa del ordenamiento estructural que provoca un acoplamiento entre los dipolos de cada enlace peptídico, lo que da lugar también a una señal positiva a  $\approx 192$  nm para esta transición; con las estructuras de lámina  $\beta$  también se observa este tipo de acoplamiento para la transición  $\pi-\pi^*$ , detectándose para el caso de las estructural antiparalelas una señal negativa a 218 nm y una positiva a 195 nm. La interacción con ligandos o moléculas del medio, la formación de oligómeros o la diferente proporción de los dominios estructurales que forman parte de los compuestos mencionados puede alterar los valores representativos de los mismos, tal y como ocurrió con los péptidos RIA7 estudiados.



**Figura 50.** Adaptación esquemática de espectros de dicroísmo circular correspondientes a polipéptidos con un 100% de conformación de las siguientes estructuras secundarias: hélice  $\alpha$  (rojo), lámina  $\beta$  (azul), giro  $\beta$  tipo I (verde), giro  $\beta$  tipo II (amarillo) y ovillo estadístico (negro) (Perczel and Fasman 1992; Kelly et al. 2005).

Debido a estas capacidades de detección, por su simplicidad, rapidez y al tratarse de un método no destructivo para la muestra, el análisis por CD se ha convertido en un complemento perfecto para otros métodos más precisos, tales como la RMN. Por ello, ha sido una herramienta indispensable para la realización de este proyecto, ya que es un método muy empleado actualmente para la elucidación de estructuras secundarias y para la monitorización de posibles cambios debidos a la interacción con ligandos o a la variación de las condiciones del entorno, tales como pH, agentes desnaturantes, T, etc.

#### 8.4. Espectrometría de fluorescencia

Al igual que el uso de la espectroscopia por CD, los ensayos de fluorimetría han sido de gran utilidad a lo largo de este trabajo, tanto para los análisis de interacción con RNAs en el caso de los péptidos RIA7, como para los experimentos entre arenos y KIA7I o los ensayos de KIA $\beta$ W en presencia de NTPs. Ya sea a través de métodos de dispersión de luz para la detección de formación de agregados, la monitorización de fluorescencia en ensayos de unión a ANS o el cálculo del apantallamiento de la fluorescencia debido a la interacción con los grupos aromáticos que la emiten, esta ha sido otra de las técnicas experimentales cruciales para nosotros. Además, es una técnica muy empleada para detectar ciertas conformaciones de péptidos, según el grado de unión a determinados ligandos, tal y como ocurre con, por ejemplo: la tioflavina T, un compuesto que se une de forma específica a amiloides y provoca un aumento de la fluorescencia y un desplazamiento de las señales

hacia el rojo en los espectros de emisión de fluorescencia; o el ANS, empleado durante este trabajo, que interacciona con estructuras de glóbulo fundido y cuyas propiedades detallaremos a continuación.

Péptidos y proteínas suelen contener una pequeña proporción de Tyr o Trp en su composición, capaces de absorber luz a una determinada longitud de onda UV para después emitir fotones. (Lakowicz 2006). Gracias a su gran sensibilidad, la espectrometría de fluorescencia nos permite obtener información acerca de cambios en el medio y variaciones en la estructura de los péptidos y proteínas (alteraciones en la transición de una conformación a otra, asociación de subunidades, agregación, uniones a ligando, fenómenos de desplegamiento o desnaturalización). Incluso nos permitirá distinguir si el entorno de las moléculas analizadas es polar (350 nm), o hidrófobo (< 335 nm) con solo detectar la longitud de onda a la que aparece el pico máximo de emisión de fluorescencia para el Trp (Gonnelli and Strambini 2005). La fluorescencia emitida por un compuesto viene caracterizada por varios parámetros, tales como la intensidad ( $IF = n_{Em} \cdot E$ , siendo  $n_{Em}$  el número de fotones emitido), el rendimiento cuántico ( $\Phi_F = n_{Em} / n_{Abs}$ , siendo  $n_{Abs}$  el número de fotones absorbido) o el tiempo de vida medio ( $\tau_0$ , tiempo que el fluoróforo permanece en el estado excitado).

Los experimentos se llevan a cabo en un espectrofluorímetro modelo Jobin Yvon Fluoromax 4 dotado de un dispositivo Peltier para el control de la temperatura. De forma muy general, se compone de una fuente de luz de excitación (lámpara de arco de Xe, en nuestro caso) que se hace pasar a través de un filtro o monocromador para seleccionar la longitud o longitudes de onda deseadas y después incidir sobre la muestra. Parte de esta luz incidente es absorbida por la muestra y si algunas de las moléculas presentes en ellas son capaces de emitir fluorescencia, tras pasar por un segundo filtro, esta llegará al detector o fotomultiplicador equipado con un contador de fotones. Este segundo filtro estará normalmente situado a 90° respecto al haz de luz de excitación incidente para evitar interferencias de reflexión o transmisión y lograr mejorar la relación señal/ruido. En el caso de los detectores multicanal, que recogen la intensidad de luz en todas las longitudes de onda de forma simultánea, será innecesario el uso del segundo monocromador. En el equipo empleado, al poseer monocromadores dobles y una fuente de luz de excitación continua, podemos registrar tanto un espectro de excitación, como un espectro de fluorescencia, para así comprobar que las variaciones detectadas no son debidas a cambios en la absorción de fotones por parte de la muestra. Para contener las muestras se hizo uso de una microcubeta de cuarzo con un volumen de 0,13 mL y un paso de luz de 3 mm, colocada en un portacubetas.



### 8.4.1. Dispersión de luz

En los estudios de interacción del péptido RIA7 con RNAs de diferente naturaleza estructural se pudo observar cierta turbidez durante la preparación de las muestras al añadir ambos componentes, lo que condujo a pensar en la posibilidad de que existía un fenómeno de agregación entre ellos. Entre las pruebas realizadas para confirmar la formación de agregados destacaba la detección de dispersión de luz a 90° para el haz de excitación empleado en los ensayos de fluorescencia (Amiri et al. 2012). Se decidió usar unas  $\lambda_{\text{Ex}}$  lo suficientemente elevadas como para evitar que la absorbancia de los RNAs ( $\epsilon_{\text{max}} \approx 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , por nucleótido, a 260 nm), con un coeficiente de extinción muy superior al de las Tyr ( $\epsilon_{\text{max}} \approx 1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , a 280 nm), pudiese interferir en la emisión de fluorescencia por parte de las moléculas del péptido. Así, estando seguros de que la señal detectada era completamente debida a la totalidad de los residuos de Tyr de RIA7 que actuaban como fluoróforos, en caso de que existiese difracción debida a la formación de agregados, podríamos observarla mediante la detección de dispersión de luz a la longitud de onda de excitación.

Al igual que otros métodos basados en la dispersión de luz, tales como la espectroscopia de Raman (Oladejo et al. 2011) o los ensayos de dispersión de luz tanto estático como dinámico, que usualmente emplean láseres infrarrojos para detectar parámetros vibracionales en las nubes electrónicas de las moléculas, en el caso de la fluorimetría estamos también ante una técnica altamente sensible. Al contrario que los fenómenos de fluorescencia, en el caso de la dispersión de luz lo que se detecta no es una transición electrónica entre diferentes estados energéticos, sino que se monitoriza la luz que es desviada tras su interacción con la materia. Así, cuando los fotones de energía colisionan con los átomos de las moléculas, pueden hacerlo de dos formas: no elástica, si los fotones desviados poseen una energía distinta de la que tienen los fotones incidentes, en cuyo caso habrá tenido lugar algún tipo de interacción con la molécula; o elástica, si no existe una diferencia de carga neta en ninguna de las partes, de modo que los fotones desviados tendrán el mismo valor de energía que los fotones incidentes, produciéndose entonces la dispersión de luz. Para este tipo de experimentos de monitorización de la agregación, en nuestro caso, tomamos ventaja de este último tipo de colisión también denominada dispersión de Rayleigh, el mismo fenómeno que da explicación al color en el cielo de nuestro planeta (Hof 2003).

Aunque estos mismos experimentos podrían realizarse mediante los análisis por UV-CD explicados anteriormente, se decidió usar la fluorimetría al ofrecer resultados más fiables optimizando al máximo los recursos de los que se disponía (Benjwal et al. 2006). Como se pudo observar, al hacer pasar un haz de luz polarizada a través de las muestras, dado que presentaban partículas formadas por la agregación, en lugar de ser absorbida por los fluoróforos, esta era

dispersada y podía ser detectada en el mismo rango de longitudes de onda que la luz empleada para la excitación. Así, pudimos realizar un seguimiento de la fluorescencia de los residuos de Tyr y de la formación de agregados de manera simultánea, detectando la intensidad de la luz recibida a las  $\lambda_{Em}$  y  $\lambda_{Ex}$ , respectivamente.

#### 8.4.2. Fluorescencia del ANS

Cuando la molécula de estudio, en este caso el péptido KIA7I, carece parcial o totalmente de una proporción de fluoróforos intrínsecos (Trp o Tyr) lo suficientemente grande como para ser detectada, se recurre a un compuesto externo que aporte la capacidad de absorción y emisión de luz necesarias para, como es nuestro caso, averiguar algo sobre su estado conformacional. Entre los compuestos que se emplean destacan: fluoresceína, DNS, ITC, TNS, ANS, GFP, etc. En esta ocasión se empleó el ANS, un fluoróforo extrínseco que es capaz de unirse a péptidos y proteínas de forma no covalente y presenta una ligera fluorescencia ( $\lambda_{Abs\ max} \approx 374\ nm$  y  $\epsilon_{max} \approx 6,8 \cdot 10^{-3}\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) que aumenta al interaccionar con ellos y al disminuir la polaridad del medio que lo rodea, desplazándose el máximo detectado hacia longitudes de onda menores ( $\lambda_{Em\ max} \approx 454\ nm$ ,  $\Phi_F \approx 0,98$  y  $\tau_0 \approx 16\ ns$ ) (Albani 2008). Se ha demostrado que la fluorescencia del ANS se ve incrementada cuando interacciona con conformaciones de glóbulo fundido parcialmente estructuradas, pero esto no ocurre en el caso de estados en conformación de ovillo estadístico poco plegados o completamente desplegados (Semisotnov et al. 1991). Esta característica fue empleada para realizar un seguimiento de cómo la interacción con los diferentes arenos añadidos al medio podía afectar a la estructura del péptido. Aunque la fluorescencia de los compuestos aromáticos por sí mismos es casi nula, sí son capaces de absorber luz UV a  $\lambda \approx 200 - 300\ nm$ , por lo que se utilizó una  $\lambda_{Ex} = 365\ nm$  para evitar la pérdida de intensidad de luz y asegurarnos que toda la fluorescencia detectada era debida al ANS (Cockell and Knowland 1999; Bhartia et al. 2008).

### 8.4.3. Apantallamiento

Se ha demostrado que moléculas que presentan fluorocromos en su estructura pueden verse sometidas a fenómenos de apantallamiento por la presencia de compuestos externos que alteren el rendimiento cuántico de la fluorescencia, tal y como parece ocurrir en mayor o menor medida en el caso de los péptidos KIA $\beta$ W estudiados, al interactuar con los diferentes NTPs. Se habla de apantallamiento dinámico en caso de que el “quencher” colisione de alguna forma con los fluoróforos provocando una pérdida de energía y de apantallamiento estático si se establece una interacción entre ambos, como ocurriría en nuestro caso, donde parece existir una unión péptido-ligando entre los péptidos KIA $\beta$ W y los NTPs. Teniendo en cuenta los diferentes parámetros que definen la fluorescencia de un compuesto, mencionados anteriormente, este apantallamiento supondría un descenso en el número de fotones emitidos ( $n_{Em}$ ) y, por lo tanto, una menor intensidad ( $I_F$ ) para la fluorescencia detectada, lo que a su vez repercutiría de forma negativa en el valor del rendimiento cuántico de la misma ( $\Phi_F$ ). Por el contrario, el tiempo de vida medio ( $\tau_0$ ) no variaría ya que seguiríamos detectando el valor ofrecido por los fluoróforos que no se encontrasen formando complejos, a diferencia de lo que ocurriría en el apantallamiento dinámico donde la pérdida de energía tras la colisión daría lugar a un  $\tau_0$  menor. Como se ha podido comprobar a lo largo de los experimentos de fluorescencia, también existe un apantallamiento térmico que provoca un aumento de la eficacia del apantallamiento a medida que se eleva la temperatura. Ello ocurre debido a que, a mayor temperatura, crece el número de colisiones intramoleculares teniendo lugar alteraciones en la dinámica de los átomos que forman parte del entorno en el que se encuentran los fluoróforos.

Los péptidos KIA $\beta$ W fueron diseñados de forma que los residuos de Trp enfrentados en diagonal actuaran como un dominio capaz de otorgar estabilidad y facilitar una correcta estructuración de las horquillas formadas. No obstante, dicho par Trp-Trp también es muy susceptible de sufrir apantallamiento dinámico por la facilidad para donar electrones que se observa en el estado excitado de los anillos indólicos, lo que ocurre especialmente cuando los Trp presentan un alto grado de exposición al solvente. Aunque no fuésemos capaces de diferenciar entre la aportación a la fluorescencia de cada uno de los dos residuos de Trp, sí que pudimos monitorizar el apantallamiento de la emisión y con ello logramos realizar hipótesis sobre la disposición del par WW, el plegamiento de las horquillas  $\beta$  y las diferencias en la interacción con los NTPs.

## 8.5. Espectroscopia de RMN

La RMN se fundamenta en la interacción de la radiación electromagnética con los núcleos atómicos en presencia de un campo magnético, la cual, al depender del entorno en el que se encuentren nos da información acerca de la disposición y propiedades fisicoquímicas de los mismos. Dichos núcleos deben de ser susceptibles al campo magnético, es decir, poseer un momento magnético de espín distinto de cero, por ejemplo:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  o  $^{31}\text{P}$ . De cara a los análisis por espectroscopia de RMN, es preferible que dichos átomos tengan una abundancia natural lo más elevada posible y un número cuántico magnético o de espín nuclear ( $m$ ) de  $1/2$  para lograr que las señales obtenidas sean lo suficientemente claras e intensas. Estos núcleos están caracterizados por un momento angular intrínseco o espín ( $I$ ) y un momento magnético ( $\mu$ ) asociado que dependerá de la orientación del espín y es el parámetro que se manipula durante los experimentos de RMN. Al introducir la muestra en los espectrómetros de RMN y aplicar el campo magnético, los isótopos con  $I = 1/2$  pueden orientarse de dos formas adoptando dos estados para  $m$  ( $+1/2$  o  $-1/2$ , también denominados arriba y abajo o  $\alpha$  y  $\beta$ ). En ausencia de un campo magnético, las energías de esos estados se encuentran degeneradas, es decir, son iguales y existe el mismo número de átomos en un estado que en el otro, haciendo  $\mu = 0$ . Al someter dichos átomos a un campo magnético ( $B_0$ ),  $I$  queda orientado en la misma dirección que el campo (en el eje  $+z$ ), haciendo que  $\mu$  deje de ser nulo al encontrarse el estado de menor energía alineado del mismo modo y el de mayor energía en la dirección opuesta ( $-z$ ). Según el efecto Zeeman,

$$\Delta E = \frac{\mu \cdot B}{I} \quad (8)$$

la diferencia de energía entre ambos estados depende, de forma proporcional, de la intensidad del campo magnético aplicado. Mediante la ecuación del Boltzmann,

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E / K \cdot T} \quad (9)$$

se puede calcular la población de átomos en uno y otro estado de espín, existiendo una predilección por orientarse hacia el estado de menor energía. Las componentes del vector de espín variarán en el plano  $xy$  al precesionar este alrededor del campo magnético en  $z$ , con una frecuencia denominada frecuencia de resonancia de Larmor ( $\omega_0$ ) (Levitt 2008).

En el equilibrio, al sumarse todas estas componentes, dan lugar a una componente de magnetización neta ( $M$ ) orientada en la misma dirección que  $B_0$  y con una magnitud proporcional a la diferencia de poblaciones atómicas en uno u otro estado. Así, para lograr que exista una situación

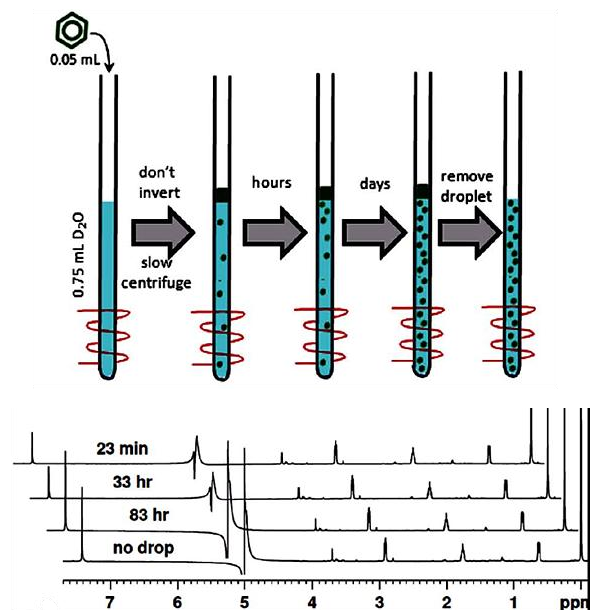
de resonancia entre  $\alpha$  y  $\beta$ , habrá que aplicar una radiación electromagnética de frecuencia similar a la diferencia de energía entre ambos ( $\approx$  MHz), denominada frecuencia de Larmor ( $\nu$ , dependiente de una constante giromagnética  $\gamma$ ):

$$\nu = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \quad (10)$$

Aplicando un pequeño pulso con una frecuencia similar a  $\nu$  en un plano perpendicular a  $B_0$  generaremos un segundo campo magnético ( $B_1$ ) con el que podremos inducir cambios en las poblaciones de estados de espín. Durante el tiempo que dure el pulso, se inducen rotaciones de los espines nucleares, generándose una magnetización macroscópica orientada en una dirección determinada. Al finalizar el pulso, los núcleos vuelven a la situación de equilibrio emitiendo radiación electromagnética (“Free Induction Decay” o FID).

No obstante, no todos los núcleos presentes en la muestra, aunque sean de isótopos similares, resuenan de la misma forma, ya que existen efectos locales debidos a los demás núcleos próximos y un efecto de apantallamiento de la resonancia causado por las nubes electrónicas que hay alrededor, por lo que habrá que considerar un campo efectivo ( $B_{\text{eff}}$ ) diferente de  $B_0$ , según el entorno fisicoquímico en el que se encuentre cada núcleo. Del mismo modo, la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado variará, obteniéndose diferentes picos en los espectros de RMN, correspondientes a las distintas frecuencias de resonancia. Por lo tanto, esta técnica nos permitirá conocer detalles sobre la composición química de las moléculas a nivel atómico. Es por ello que se ha convertido en una herramienta indispensable para la investigación bioquímica moderna, ya que nos ofrece la oportunidad de realizar estudios estructurales con resolución atómica en condiciones muy similares a las fisiológicas, caracterizar las propiedades dinámicas de las macromoléculas biológicas y monitorizar su interacción con las moléculas del medio para conocer mejor su funcionalidad (Wüthrich 1986; Levitt 2008).

En nuestro caso, hemos hecho uso de espectrómetros Bruker de 600 (14,1 T) y 800 MHz (18,8 T) y tubos de resonancia tanto de 3 como de 5 mm, además de tubos Shigemi en caso de disponer de poco volumen de muestra con una concentración aceptable. El espectrómetro de 800 MHz posee una criosonda que enfría la bobina de detección de radiofrecuencias y reduce el ruido térmico, mejorando mucho la relación señal/ruido en los espectros, lo que consigue minimizar el tiempo de duración de los espectros y la concentración necesaria para las muestras analizadas. En ocasiones también habrá que llevar a cabos protocolos de preparación de las muestras adaptados a las necesidades de nuestros experimentos, tal y como se hizo durante la preparación de las muestras para la optimización de los experimentos de KIA7I en presencia de distintos arenos (Figura 51).



**Figura 51.** Protocolo llevado a cabo para la preparación de las muestras de KIA7I en presencia de diferentes arenas. Los cambios en la concentración de areno (benceno en este caso) disuelto en agua fueron controlados durante tres días por RMN con espectros 1D  $^1\text{H}$ . El pico de resonancia característico del benceno en este ejemplo, posee un  $\delta$  de 7.42 ppm, y su área es alrededor de un 13% el área del pico del DSS empleado como referencia. Inicialmente, el área de dicho pico se mantuvo estable durante 40 horas y después aumentó hasta alcanzar el 35% del área del pico del DSS. Tras 90 horas de incubación, se retiró la gota de benceno con una pipeta y la señal detectada para el areno era similar a la obtenida antes de retirar la gota de compuesto. La concentración del compuesto aromático se mantiene estable durante 40 horas, para después mezclarse y alcanzar la zona captada por la bovina del detector, mientras que la gota de areno puro permanece en la parte superior (Diez-García et al. 2011).

Durante la adquisición de los espectros de RMN, con el fin de tener un  $\delta = 0$  ppm para usar como referencia y asignar el resto de  $\delta$  correspondientes para cada uno de los picos que aparecen, se puede emplear tetrametilsilano (TMS), ácido 3-tri(metilsilil)propiónico-D4 (TMSP o TSP) o, como usamos durante nuestros experimentos, 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS), que no genera interferencias con las resonancias de los núcleos de las muestras analizadas, es soluble en agua y su señal no es dependiente de ciertas variables del entorno, como sí ocurre con el TSP, cuya señal es sensible a los cambios de pH. Estos dos últimos compuestos poseen mayor solubilidad en disolventes acuosos y un punto de ebullición mayor, mientras que el TMS es más empleado en disoluciones orgánicas. Todos ellos darán lugar a unos picos singletes característicos, debidos a la resonancia idéntica de los átomos de hidrógeno alrededor de los átomos de Si, los cuales se identificarán a 0 ppm y nos servirán como señales de referencia, si bien en los casos del TSP y DSS pueden detectarse otros picos, pero con una intensidad mucho menor. Además, durante el análisis estructural de KIA7I, se recurrió al DSS para comprobar la estructura de los péptidos, ya que se trata de un compuesto con una conocida capacidad para unirse a proteínas parcialmente estructuradas o con conformación de glóbulo fundido (Shimizu et al. 1994; Laurents et al. 2004).

### 8.5.1. Espectroscopia monodimensional (1D)

La aplicación de la espectroscopia de transformada de Fourier (FT) permite realizar la adquisición de un espectro de RMN en un tiempo reducido, al realizarse un barrido simultáneo de todo el rango de frecuencias, es decir, de todos los núcleos de interés independientemente de su  $\delta$ . Aplicando la FT logramos transformar la función de tiempo FID ( $f(t)$ ) en una combinación lineal de ondas armónicas de frecuencia dependiente de los tiempos de relajación, o lo que es lo mismo, en una representación espectral ( $F(\nu)$ ):

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot e^{i\nu t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot \cos \nu t dt + i \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot \sin \nu t dt \quad (11)$$

Correspondiendo las componentes real e imaginaria a las señales absorptivas y dispersivas, respectivamente.

En los experimentos de pulsos de suele distinguir una fase de preparación en la que se aplican uno o varios pulsos de radiofrecuencias que reorientan los espines nucleares, para pasar después a una fase de detección, en la que el sistema de espines vuelve al equilibrio emitiendo la FID. Con el fin de obtener una mayor sensibilidad en las señales (mejor relación señal/ruido en los espectros finales) esta secuencia de pulsos se repetirá el número de veces programado.

En los espectros obtenidos, cada uno de los picos adquiridos corresponde a la frecuencia de resonancia de los núcleos detectados y poseen un determinado desplazamiento químico concreto respecto de la frecuencia tomada como referencia ( $\delta_{\text{(ppm)}} = [(\omega_{\text{señal}} - \omega_{\text{referencia}})/\omega_{\text{referencia}}] \cdot 10^6$ ). La escala de desplazamientos químicos permite expresar las frecuencias de resonancia, independientemente de la intensidad del campo magnético aplicado  $B_0$  (Lian and Roberts 2011). Si existe algún tipo de acoplamiento escalar entre núcleos próximos (transmitido a través de los enlaces y dependiente de los ángulos diedros) tendrá lugar una transferencia de magnetización entre ellos y las señales correspondientes se observarán en forma de multipletes, con varios picos separados cierta distancia, según el número de núcleos que estén implicados y la intensidad de las interacciones, la cual se encontrará definida por la constante de acoplamiento (J), también independiente de  $B_0$  (Derome 1987).

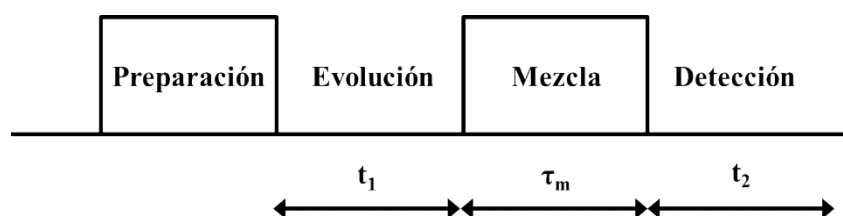
En péptidos y proteínas desplegadas las señales de resonancia de núcleos  $^1\text{H}$  tienden a agruparse de forma característica en ciertas regiones de los espectros, mientras que en el caso de proteínas plegadas, al encontrarse estos núcleos en microentornos distintos, las señales de  $^1\text{H}$  muestran una mayor diversidad de desplazamientos químicos. Así, por ejemplo, a través de la monitorización de esta diversidad o dispersión en el conjunto de  $\delta$  detectados, hemos podido realizar

un seguimiento de los procesos de plegamiento y desplegamiento de los péptidos RIA7 y KIA $\beta$ W, en función de diferentes condiciones de temperatura, pH, concentración, presencia de ligandos, etc.

### 8.5.2. Espectroscopia multidimensional

Debido a la gran cantidad de átomos de las macromoléculas, es frecuente que los desplazamientos químicos de los numerosos núcleos queden solapados en los espectros de RMN. Aquí es donde la espectroscopia de RMN multidimensional juega un papel crucial, al permitirnos diferenciar entre núcleos con desplazamientos químicos muy similares.

La secuencia general de pulsos para un espectro bidimensional se muestra de forma esquemática en la Figura 52. Al igual que en espectroscopia monodimensional, la variación de la señal durante el tiempo de adquisición ( $t_2$ ) es lo que se conoce como FID y su transformada de Fourier da lugar a una señal de frecuencia característica. En espectroscopía 2D se realizan varios experimentos del mismo tipo variando para cada uno de ellos el tiempo de evolución ( $t_1$ ), la variación de la magnetización con el tiempo  $t_1$ , para cada valor de tiempo  $t_2$ , origina una curva similar a la FID sobre la que también se puede realizar una transformada de Fourier. El resultado de un experimento de estas características consiste en una matriz de datos cuya transformada de Fourier en ambos dominios de tiempo,  $t_1$  y  $t_2$ , origina el espectro bidimensional en el que cada señal es función de dos frecuencias:  $\omega_1$  en la dimensión vertical y  $\omega_2$  en la horizontal. Las señales pertenecientes a la diagonal del espectro 2D homonuclear corresponden al espectro 1D, mientras que las señales fuera de la diagonal correlacionan los núcleos entre los que se ha producido transferencia de magnetización durante el periodo de mezcla  $\tau_m$ .



**Figura 52.** Secuencia general de pulsos de un espectro de RMN bidimensional.

Dependiendo del tipo concreto de experimento bidimensional, puede eliminarse parcialmente el solapamiento y además se puede obtener información diversa que dependerá del fenómeno que relacione los valores de frecuencias en ambas dimensiones.



La secuencia general de pulsos consta, en primer lugar, de un periodo de preparación que permite al sistema llegar al equilibrio y convertir la magnetización longitudinal en transversal. A continuación, hay un periodo de evolución en el que se registra información sobre una frecuencia que evoluciona durante  $t_1$ . Durante el tiempo de mezcla, el sistema parte de un estado de no equilibrio y se produce una transferencia de magnetización del núcleo cuya frecuencia evolucionó con  $t_1$  a un núcleo con el que esté conectado, escalar o dipolarmente, y cuya frecuencia evolucionará durante el tiempo de detección  $t_2$ . En función de cómo sea este periodo de mezcla se obtendrán los diferentes experimentos bidimensionales entre dos núcleos de distinta frecuencia. El resultado será un pico de correlación en el espectro bidimensional entre dos protones de distinta frecuencia. Si en la Figura 52 se introducen un mayor número de periodos de evolución y de mezcla se obtienen los espectros tri- (3D) y tetradimensionales (4D), que son necesarios para la determinación de estructuras de biomoléculas de elevado peso molecular.

Los experimentos multidimensionales: pueden ser de correlación homonuclear (como COSY, TOCSY y NOESY), en los que intervienen resonancias correspondientes al mismo tipo de núcleos en todas las dimensiones, y heteronucleares, si se excitan y se detectan señales de diferentes núcleos. En este proyecto, se usaron experimentos heteronucleares del tipo HSQC. Los espectros de RMN 2D COSY y TOCSY nos sirvieron para conocer los acoplamientos escalares entre protones que mostraban interacciones a través de enlace en las moléculas estudiadas, es decir, que nos permitieron identificar los diferentes aminoácidos que formaban parte de los péptidos estudiados. Los NOEs entre las señales situadas entre 7-10 (protones amídicos) y 4-6 ppm (protones  $\alpha$ ) fueron de gran ayuda durante la asignación de las cadenas laterales y el reconocimiento de los diferentes aminoácidos. Los experimentos 2D NOESY fueron de utilidad para identificar los NOEs debidos a procesos de intercambio químico entre protones y así monitorizar cambios estructurales u otros procesos dinámicos. Los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC ofrecieron resultados cruciales para identificar residuos con señales de protón solapadas. En nuestro caso, estos experimentos se realizaron en abundancia natural, aunque su sensibilidad aumentaría enormemente si las muestras se enriqueciesen isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ .

El análisis conformacional de  $\delta$  y la interpretación de los NOEs detectados fueron empleadas para el cálculo de las conformaciones secundarias y estructuras 3D calculadas mediante software especializado, así como también nos permitieron realizar estudios sobre funcionalidad, interacción con ligandos, propiedades de plegamiento y monitorización de la conformación respecto a diferentes solventes o valores de pH y temperatura.

### 8.5.3. Asignación de espectros

Para lograr identificar las diferentes señales detectadas en los experimentos de RMN, se tienen en cuenta valores de referencia para los desplazamientos químicos recogidos en diferentes bases de datos, tales como la base de datos de resonancia magnética biológica (Ulrich et al. 2008), así como el apantallamiento que sus señales puedan sufrir, tanto para aminoácidos como para nucleótidos. Para la asignación de los espectros se identifica en primer lugar la señal de referencia correspondiente a 0 ppm. La estrategia a seguir comienza con la asignación de los protones amídicos de la cadena principal, los cuales presentarán señales con los protones de las cadenas laterales en los diferentes residuos, al menos hasta los protones  $\beta$  de las mismas. Las señales entre los residuos dependerán de las estructuras que los péptidos adopten, cada una de las cuales tendrá señales de RMN características ( $^1\text{HN}-^1\text{HN}_{(i,i+1)}$ ,  $^1\text{HN}-^1\text{H}\beta_{(i,i+1)}$  o  $^1\text{HN}-^1\text{H}\alpha_{(i,i+1,3,4)}$  en el caso de las hélices  $\alpha$  o las detectadas entre los residuos enfrentados en el caso de las láminas  $\beta$ ). Así, tendremos grupos de señales para cada residuo de forma individual, correlaciones secuenciales entre residuos inmediatamente adyacentes y grupos de señales que podemos asociar a fragmentos concretos de las moléculas. Los diferentes experimentos de RMN 2D heteronucleares fueron de gran ayuda a la hora de asignar los protones cuyas señales quedaban solapadas en los espectros NOESY. Las ambigüedades que puedan aparecer tras la asignación preliminar de los espectros serán después exhaustivamente analizadas en función de las estructuras esperadas, tal y como fue necesario hacer en el caso de la asignación de los espectros de KIA $\beta$ W.

## 8.6. Procedimientos de dinámica molecular (MD)

Durante los últimos años, los estudios de dinámica molecular han adquirido un gran protagonismo en los estudios estructurales y de interacción de péptidos y proteínas, gracias a los avances informáticos y su aplicación al cálculo de los parámetros bioquímicos que definen el comportamiento de las biomoléculas (Levitt 2001; Dodson et al. 2008). Así, desde los postulados iniciales de van der Waals y Boltzmann, englobando los primeros estudios realizados empleando la mecánica clásica, semiclásica, cálculos que recogen parámetros mecano-cuánticos o mecánica estadística, los cálculos de dinámica molecular actuales se nutren de todo ello para centrarse en el estudio de la energía interna, la reactividad y la disposición espacial de moléculas cada vez más

complejas (Alder and Wainwright 1957; Rahman 1964; McCammon et al. 1977). En este sentido, a lo largo de este proyecto, hemos empleado varias herramientas de cálculo que nos han permitido determinar la estructura de los péptidos estudiados a partir de datos extraídos de los experimentos de RMN. Los valores de desplazamiento químico, las constantes de acoplamiento de cada espín nuclear, los tiempos de mezcla seleccionados y los NOEs detectados, nos proporcionarán información acerca del comportamiento de las moléculas analizadas, las diferentes conformaciones existentes y el plegamiento de las mismas (Prompers and Bruschweiler 2002; Koller et al. 2008).

### 8.6.1. CYANA

Tras la adquisición de los espectros de RMN y la asignación semiautomática de los desplazamientos químicos obtenidos, empleando los programas Sparky (Goddard and Kneller) y CcpNmr (Vranken et al. 2005), se lleva a cabo un cálculo de las estructuras de los péptidos estudiados con el programa CYANA (Güntert et al. 1997; Güntert 2003; López-Méndez and Güntert 2006). La asignación de los NOEs a distancias inter-protónicas específicas se llevó a cabo de manera automática por el propio programa CYANA, aunque en la mayoría de los casos, fue necesario asignar, revisar y seleccionar de forma manual las señales inter o intramoleculares correspondientes a la forma específicamente plegada de los compuestos analizados. De la misma forma que su predecesor DYANA (Güntert et al. 1997), el cálculo de CYANA, tanto manual como automático, nos permiten realizar el cálculo de modelos estructurales en tres dimensiones a partir de una secuencia primaria dada, unas listas de picos y otras de desplazamientos químicos extraídos de los experimentos de RMN multidimensionales. Adicionalmente, podemos introducir otros parámetros como ángulos de torsión, restricciones de distancia o rangos de tolerancia distintos a los predeterminados.

Observando los archivos de salida generados tras el cálculo, hay que revisar las restricciones que presenten violaciones de distancia, así como aquellas que no se correspondan con las asignadas manualmente. Para que las restricciones entre protones observadas sean consideradas asignaciones mayoritariamente válidas, se deben de cumplir una serie de requisitos: debe haber una correlación entre los desplazamientos químicos y la posición de los picos, tienen que adaptarse correctamente a la red tridimensional y deben de encontrarse próximos en la estructura preliminar calculada.

Inicialmente, CYANA realiza una lectura y asignación de los picos (.peaks), en base a una lista de desplazamientos químicos (.prot) extraídos de los experimentos de RMN, pudiéndose incluir los picos correspondientes a  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  y/o  $^{13}\text{C}$ . Los picos asignados se convierten en restricciones de distancias interprotónicas. CYANA utiliza también otro tipo de restricciones, como restricciones de ángulos de torsión del esqueleto (.aco) derivadas de valores estadísticos de desplazamientos químicos obtenidas por el programa TALOS (Delaglio et al. 1995).

En un primer cálculo se obtienen límites de las distancias de las restricciones experimentales propuestas (.upl), las cuales se usarán durante el paso siguiente para lograr las coordenadas. Al mismo tiempo, se obtienen valores estadísticos donde se nos indicarán los posibles errores encontrados durante el proceso, el porcentaje de átomos asignado y un conjunto de datos que nos darán una idea de la fiabilidad del cálculo. A partir de estos archivos de distancias y ángulos, CYANA realizará el cálculo de un número determinado de confórmeros según la secuencia dada, obteniéndose el archivo con la estructura tridimensional (.pdb) y también una lista de las violaciones encontradas para los límites y restricciones propuestos (.ovw). De este modo, podremos revisar los posibles NOEs que hayamos podido asignar erróneamente y editar la lista de distancias. Este proceso se repite hasta lograr conformaciones consistentes con las restricciones experimentales.

Cabe destacar que, para el caso de la conformación de KIA $\beta$ W calculada en presencia de diferentes NTPs, fue necesario introducir las coordenadas espaciales de los átomos de estos ligandos en la librería que usa CYANA para que reconociese los desplazamientos químicos asignados para dichos compuestos. Gracias a paquetes de software como MOLMOL (Koradi et al. 1996) y PyMOL (DeLano 2002), dedicados a la representación gráfica de las moléculas resultantes, podremos monitorizar los resultados obtenidos en los diferentes formatos durante cada una de las etapas del cálculo. El análisis de las estructuras se llevó a cabo empleando este mismo software.

### 8.6.2. AMBER

Una vez determinadas las estructuras con CYANA, se procedió a realizar un refinamiento con el programa de dinámica molecular AMBER (Kollman et al. 2002). Este paquete se utilizó para refinar las estructuras experimentales de los péptidos KIA $\beta$ , y para obtener un modelo teórico, en el caso de KIA7I, en el que la información experimental (número de NOEs) no era suficiente para determinar la estructura. AMBER es un paquete de dinámica molecular que, al contrario de

CYANA, trabaja en el espacio de coordenadas cartesianas y hace uso de un campo de fuerzas mucho mas sofisticado que este. Además permite realizar refinamientos de la estructura teniendo en cuenta el solvente de manera explícita. En AMBER podemos introducir los datos de los espectros de RMN de forma muy similar a como se hace con CYANA, definiendo un término de potencial que depende de las violaciones de las restricciones experimentales, ya sean restricciones de distancias o angulares.

Para el cálculo de los modelos teóricos de KIA7I, partimos de 10 conformaciones de KIA7 donde mutamos el residuo de Tyr por Ile con el programa SYBYL, un programa gráfico que combina diferentes paquetes de modelado molecular y química computacional. Se añadieron iones  $\text{Cl}^-$  para anular la carga neta del sistema, dado el carácter catiónico de los péptidos KIA7I. En primer lugar se realizó una minimización en vacío con un número máximo de 1000 ciclos, utilizando un límite de distancias de 10 Å para las interacciones electrostáticas. Seguidamente se realizó un cálculo en un entorno acuoso, para lo cual se definió una caja de hidratación con moléculas de agua con el modelo TIP3P (“transferable interatomic potential”, con potenciales de 3 cargas) (Jorgensen et al. 1983; Mahoney and Jorgensen 2000). Esta caja de hidratación contenía alrededor de 6800 moléculas de agua repartidas en una caja de 234 nm<sup>3</sup>, seleccionando unos radios adecuados para que no provocasen ningún tipo de interferencia o solapamiento con los átomos de los péptidos. Se realizó una minimización de 5000 ciclos y se sometió todo el sistema a un proceso de equilibrado del solvente en el que las coordenadas del péptido permanecían fijas (opción *ibelly*). Posteriormente se realizaron sucesivos cálculos en los que se liberaba el movimiento del soluto de manera paulatina, hasta permitir el movimiento sin restricciones de todo el sistema. En este momento se considera el sistema equilibrado y comienza la llamada fase “productiva” del cálculo de dinámica molecular. Este cálculo consistió en 10000 ciclos de dinámica molecular, equivalentes a 0,002 ps cada uno (Diez-García et al. 2011).

En el caso de los procesos de refinamiento de las estructuras de KIA $\beta$ W el procedimiento llevado a cabo fue similar, teniendo en cuenta que para la minimización de la función blanco, en el caso de los experimentos con ATP, habría que considerar dos moléculas por separado. Para ello, del mismo modo que ocurrió durante los cálculos con CYANA, se modificó la librería de AMBER para el caso del ATP. Además, como en esta ocasión partíamos de estructuras basadas en los resultados obtenidos por RMN, en lugar de recurrir a un modelo explícito del solvente, empleamos un entorno acuoso de manera implícita, usando el modelo generalizado de Born (Pantoja-Uceda et al. 2009).

## **9. BIBLIOGRAFÍA**



- Albani, J. R. (2008). Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Chichester, GBR, Wiley.
- Alder, B. J. and T. E. Wainwright (1957). "Phase Transition for a Hard Sphere System." J Chem Phys **27**(5): 1208-1209.
- Alston, R. W., L. Urbanikova, J. Sevcik, M. Lasagna, G. D. Reinhart, J. M. Scholtz and C. N. Pace (2004). "Contribution of single tryptophan residues to the fluorescence and stability of ribonuclease Sa." Biophys J **87**(6): 4036-4047.
- Amend, J. P. and E. L. Shock (1998). "Energetics of amino acid synthesis in hydrothermal ecosystems." Science **281**(5383): 1659-1662.
- Amiri, R., A. K. Bordbar, M. F. Garcia-Mayoral, A. R. Khosropour, I. Mohammadpoor-Baltork, M. Menendez and D. V. Laurents (2012). "Interactions of gemini surfactants with two model proteins: NMR, CD, and fluorescence spectroscopies." J Colloid Interface Sci **369**(1): 245-255.
- Anand, V. S. and S. S. Patel (2006). "Transient state kinetics of transcription elongation by T7 RNA polymerase." J Biol Chem **281**(47): 35677-35685.
- Andersen, N. H., K. A. Olsen, R. M. Fesinmeyer, X. Tan, F. M. Hudson, L. A. Eidenschink and S. R. Farazi (2006). "Minimization and optimization of designed beta-hairpin folds." J Am Chem Soc **128**(18): 6101-6110.
- Andersson, E., B. R. Simoneit and N. G. Holm (2000). "Amino acid abundances and stereochemistry in hydrothermally altered sediments from the Juan de Fuca Ridge, northeastern Pacific Ocean." Appl Geochem **15**(8): 1169-1190.
- Arrhenius, S. (1903). The Propagation of Life in Space. Umschau. **7**: 481.
- Aubrey, A. D., H. J. Cleaves and J. L. Bada (2009). "The role of submarine hydrothermal systems in the synthesis of amino acids." Orig Life Evol Biosph **39**(2): 91-108.
- Backmann, J., G. Schafer, L. Wyns and H. Bonisch (1998). "Thermodynamics and kinetics of unfolding of the thermostable trimeric adenylate kinase from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*." J Mol Biol **284**(3): 817-833.
- Bai, Y., J. S. Milne, L. Mayne and S. W. Englander (1993). "Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange." Proteins **17**(1): 75-86.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." Science **289**(5481): 905-920.
- Bandwar, R. P., Y. Jia, N. M. Stano and S. S. Patel (2002). "Kinetic and thermodynamic basis of promoter strength: multiple steps of transcription initiation by T7 RNA polymerase are modulated by the promoter sequence." Biochemistry **41**(11): 3586-3595.
- Barbier, B. and A. Brack (1992). "Conformation-controlled hydrolysis of polyribonucleotides by sequential basic polypeptides." Journal of the American Chemical Society **114**(9): 3511-3515.
- Bayer, T. S., L. N. Booth, S. M. Knudsen and A. D. Ellington (2005). "Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA." RNA **11**(12): 1848-1857.
- Benjwal, S., S. Verma, K. H. Rohm and O. Gursky (2006). "Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments." Protein Sci **15**(3): 635-639.
- Bernal, J. D. (1949). "The Physical Basis of Life." Proceedings of the Physical Society. Section B **62**(10): 537-558.
- Betts, M. J. and R. B. Russell (2003). "{Amino acid properties and consequences of substitutions}." Bioinformatics for Geneticists **317**.
- Bhartia, R., W. F. Hug, E. C. Salas, R. D. Reid, K. K. Sijapati, A. Tsapin, W. Abbey, K. H. Nealson, A. L. Lane and P. G. Conrad (2008). "Classification of organic and biological materials with deep ultraviolet excitation." Appl Spectrosc **62**(10): 1070-1077.
- Bielski, R. and M. Tencer (2007). "A possible path to the RNA world: enantioselective and diastereoselective purification of ribose." Orig Life Evol Biosph **37**(2): 167-175.



- Blanco, F. J., G. Rivas and L. Serrano (1994). "A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution." *Nat Struct Biol* **1**(9): 584-590.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8**(2): 93-99.
- Bolt, W. and G. Zerlett (1958). "[Normal range of carbohydrate electrophoresis with toluidine blue]." *Arztl Forsch* **12**(10): I/496-498.
- Boon, C. L., D. Frost and A. Chakrabartty (2004). "Identification of stable helical bundles from a combinatorial library of amphipathic peptides." *Biopolymers* **76**(3): 244-257.
- Bourbo, V., M. Matmor, E. Shtelman, B. Rubinov, N. Ashkenasy and G. Ashkenasy (2011). "Self-assembly and self-replication of short amphiphilic beta-sheet peptides." *Orig Life Evol Biosph* **41**(6): 563-567.
- Brack, A. and L. E. Orgel (1975). "Beta structures of alternating polypeptides and their possible prebiotic significance." *Nature* **256**(5516): 383-387.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, S., C. Humphreys and T. C. Dale (2012). "Evolutionary routes from a prebiotic ANA-world." *Commun Integr Biol* **5**(2): 199-202.
- Breslow, R. and Z. L. Cheng (2010). "L-amino acids catalyze the formation of an excess of D-glyceraldehyde, and thus of other D sugars, under credible prebiotic conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(13): 5723-5725.
- Brody, J. R. and S. E. Kern (2004). "History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis." *Anal Biochem* **333**(1): 1-13.
- Bruix, M., M. Ribo, A. Benito, D. V. Laurents, M. Rico and M. Vilanova (2008). "Destabilizing mutations alter the hydrogen exchange mechanism in ribonuclease A." *Biophys J* **94**(6): 2297-2305.
- Brutscher, B., R. Bruschweiler and R. R. Ernst (1997). "Backbone dynamics and structural characterization of the partially folded A state of ubiquitin by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Biochemistry* **36**(42): 13043-13053.
- Buchner, E. (1897). "Alkoholische Ghrung ohne Hefezellen." *Ber. Dt. Chem. Ges.* **30**: 117-124.
- Burroughs, L., P. A. Clarke, H. Forintos, J. A. Gilks, C. J. Hayes, M. E. Vale, W. Wade and M. Zbytniewski (2012). "Asymmetric organocatalytic formation of protected and unprotected tetroses under potentially prebiotic conditions." *Org Biomol Chem* **10**(8): 1565-1570.
- Butterfield, S. M., W. J. Cooper and M. L. Waters (2005). "Minimalist protein design: a beta-hairpin peptide that binds ssDNA." *J Am Chem Soc* **127**(1): 24-25.
- Butterfield, S. M. and M. L. Waters (2003). "A designed beta-hairpin peptide for molecular recognition of ATP in water." *J Am Chem Soc* **125**(32): 9580-9581.
- Bywater, R. P. (2012). "On dating stages in prebiotic chemical evolution." *Naturwissenschaften* **99**(3): 167-176.
- Case, D. A., T. E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. J. Woods (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." *J Comput Chem* **26**(16): 1668-1688.
- Castrignano, T., P. D. De Meo, D. Cozzetto, I. G. Talamo and A. Tramontano (2006). "The PMDB Protein Model Database." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D306-309.
- Cech, T. R. (2011). "The RNA Worlds in Context." *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Cockell, C. S. and J. Knowland (1999). "Ultraviolet radiation screening compounds." *Biol Rev Camb Philos Soc* **74**(3): 311-345.
- Cochran, A. G., N. J. Skelton and M. A. Starovasnik (2001). "Tryptophan zippers: stable, monomeric beta-hairpins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5578-5583.
- Collins, L. J., C. G. Kurland, P. Biggs and D. Penny (2009). "The modern RNP world of eukaryotes." *J Hered* **100**(5): 597-604.

- Connelly, G. P., Y. Bai, M. F. Jeng and S. W. Englander (1993). "Isotope effects in peptide group hydrogen exchange." Proteins **17**(1): 87-92.
- Cooper, S. and C. E. Helmstetter (1968). "Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r." J Mol Biol **31**(3): 519-540.
- Crick, F. (1953). "The packing of [alpha]-helices: simple coiled-coils." Acta Crystallographica **6**(8-9): 689-697.
- Crick, F. H. (1968). "The origin of the genetic code." J Mol Biol **38**(3): 367-379.
- Crisponi, G., V. Nurchi, M. Casu and A. Lai (1993). "A multinuclear NMR study on the microscopic ionization constants of adenosine-5'-triphosphate in aqueous solution." Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy **49**(11): 1643-1649.
- Chakrabartty, A. and R. L. Baldwin (1995). "Stability of alpha-helices." Adv Protein Chem **46**: 141-176.
- Chakrabartty, A., J. A. Schellman and R. L. Baldwin (1991). "Large differences in the helix propensities of alanine and glycine." Nature **351**(6327): 586-588.
- Cheetham, G. M. and T. A. Steitz (1999). "Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex." Science **286**(5448): 2305-2309.
- Cheng, A. C., W. W. Chen, C. N. Fuhrmann and A. D. Frankel (2003). "Recognition of nucleic acid bases and base-pairs by hydrogen bonding to amino acid side-chains." J Mol Biol **327**(4): 781-796.
- Chevallet, M., S. Luche and T. Rabilloud (2006). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." Nat Protoc **1**(4): 1852-1858.
- Chieco, P., M. Pagnoni, E. Romagnoli and C. Melchiorri (1993). "A rapid and simple staining method, using toluidine blue, for analysing mitotic figures in tissue sections." Histochem J **25**(8): 569-577.
- D'Souza, I. and G. D. Schellenberg (2005). "Regulation of tau isoform expression and dementia." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 104-115.
- Dahlberg, A. E., C. W. Dingman and A. C. Peacock (1969). "Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels." J Mol Biol **41**(1): 139-147.
- Danger, G., R. Plasson and R. Pascal (2012). "Pathways for the formation and evolution of peptides in prebiotic environments." Chem Soc Rev **41**(16): 5416-5429.
- Davanloo, P., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and F. W. Studier (1984). "Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(7): 2035-2039.
- Davis, B. J. (1964). "Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins." Ann N Y Acad Sci **121**: 404-427.
- de Alba, E., M. A. Jiménez and M. Rico (1997). "Turn Residue Sequence Determines  $\beta$ -Hairpin Conformation in Designed Peptides." Journal of the American Chemical Society **119**(1): 175-183.
- de Alba, E., J. Santoro, M. Rico and M. A. Jimenez (1999). "De novo design of a monomeric three-stranded antiparallel beta-sheet." Protein Sci **8**(4): 854-865.
- de Vladar, H. P. (2012). "Amino acid fermentation at the origin of the genetic code." Biol Direct **7**: 6.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer and A. Bax (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." J Biomol NMR **6**(3): 277-293.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.
- Derome, A. E. (1987). Modern NMR techniques for chemistry research, Pergamon Press.
- Di Giulio, M. (1997). "On the RNA world: evidence in favor of an early ribonucleopeptide world." J Mol Evol **45**(6): 571-578.

- Diez-Garcia, F., A. Chakrabartty, C. G. Ibanez and D. V. Laurents (2012). "An Arg-rich Putative Prebiotic Protein Is as Stable as its Lys-Rich Variant." Arch Biochem Biophys.
- Diez-García, F., I. Gómez-Pinto, A. Chakrabartty, C. González and D. V. Laurents (2011). "Conformation specificity and arene binding in a peptide composed only of Lys, Ile, Ala and Gly." Eur Biophys J **41**(1): 63-72.
- Dodson, G. G., D. P. Lane and C. S. Verma (2008). "Molecular simulations of protein dynamics: new windows on mechanisms in biology." EMBO Rep **9**(2): 144-150.
- Doi, N., K. Kakukawa, Y. Oishi and H. Yanagawa (2005). "High solubility of random-sequence proteins consisting of five kinds of primitive amino acids." Protein Eng Des Sel **18**(6): 279-284.
- Dougherty, D. A. (1996). "Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp." Science **271**(5246): 163-168.
- Dunker, A. K., J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Higgs, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner and Z. Obradovic (2001). "Intrinsically disordered protein." J Mol Graph Model **19**(1): 26-59.
- Dyson, H. J. (2012). "Roles of intrinsic disorder in protein-nucleic acid interactions." Mol Biosyst **8**(1): 97-104.
- Eidenschink, L., E. Crabbe and N. H. Andersen (2009). "Terminal sidechain packing of a designed beta-hairpin influences conformation and stability." Biopolymers **91**(7): 557-564.
- Eidenschink, L., B. L. Kier, K. N. Huggins and N. H. Andersen (2009). "Very short peptides with stable folds: building on the interrelationship of Trp/Trp, Trp/cation, and Trp/backbone-amide interaction geometries." Proteins **75**(2): 308-322.
- Erkilic, S. and N. Bayram (2009). "Diagnostic utility of toluidine blue-stained diagnostic utility of toluidine blue-stained wet films in bronchial lavage cytology." Acta Cytol **53**(4): 416-418.
- Ferris, J. P. (1993). "Catalysis and prebiotic RNA synthesis." Orig Life Evol Biosph **23**(5-6): 307-315.
- Ferris, J. P., P. C. Joshi, E. H. Edelson and J. G. Lawless (1978). "HCN: a plausible source of purines, pyrimidines and amino acids on the primitive earth." J Mol Evol **11**(4): 293-311.
- Feverati, G., M. Achoch, J. Zrimi, L. Vuillon and C. Lesieur (2012). "Beta-strand interfaces of non-dimeric protein oligomers are characterized by scattered charged residue patterns." PLoS One **7**(4): e32558.
- Fishkis, M. (2011). "Emergence of self-reproduction in cooperative chemical evolution of prebiological molecules." Orig Life Evol Biosph **41**(3): 261-275.
- Frankel, A. D. and C. A. Smith (1998). "Induced Folding in RNA-Protein Recognition: More than a Simple Molecular Handshake." Cell **92**(2): 149-151.
- Frost, D. W., C. M. Yip and A. Chakrabartty (2005). "Reversible assembly of helical filaments by de novo designed minimalist peptides." Biopolymers **80**(1): 26-33.
- Fuchs, S. M. and R. T. Raines (2006). "Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled." Cell Mol Life Sci **63**(16): 1819-1822.
- Gallivan, J. P. and D. A. Dougherty (1999). "Cation-pi interactions in structural biology." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9459-9464.
- Garner, M. M. and A. Revzin (1981). "A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system." Nucleic Acids Res **9**(13): 3047-3060.
- Garza, A. S., N. Ahmad and R. Kumar (2009). "Role of intrinsically disordered protein regions/domains in transcriptional regulation." Life Sci **84**(7-8): 189-193.
- Gesteland, R. F., T. Cech and J. F. Atkins (2006). The RNA world : the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Gilbert, W. (1986). "Origin of life: The RNA world." *Nature* **319**(6055): 618-618.
- Goddard, T. D. and D. G. Kneller SPARKY 3. San Francisco: University of California.
- Goldberg, H. A. and K. J. Warner (1997). "The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of "Stains-all" staining in combination with silver nitrate." *Anal Biochem* **251**(2): 227-233.
- Gonnelli, M. and G. B. Strambini (2005). "Intramolecular quenching of tryptophan phosphorescence in short peptides and proteins." *Photochem Photobiol* **81**(3): 614-622.
- Green, A. A. (1931). "STUDIES IN THE PHYSICAL CHEMISTRY OF THE PROTEINS." *Journal of Biological Chemistry* **93**(2): 495-516.
- Green, A. A. (1932). "STUDIES IN THE PHYSICAL CHEMISTRY OF THE PROTEINS." *Journal of Biological Chemistry* **95**(1): 47-66.
- Greenwald, J. and R. Riek (2012). "On the Possible Amyloid Origin of Protein Folds." *J Mol Biol.*
- Griffiths-Jones, S. R., A. J. Maynard and M. S. Searle (1999). "Dissecting the stability of a beta-hairpin peptide that folds in water: NMR and molecular dynamics analysis of the beta-turn and beta-strand contributions to folding." *J Mol Biol* **292**(5): 1051-1069.
- Grimsley, G. R., J. M. Scholtz and C. N. Pace (2009). "A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins." *Protein Sci* **18**(1): 247-251.
- Grodberg, J. and J. J. Dunn (1988). "ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification." *J Bacteriol* **170**(3): 1245-1253.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." *Cell* **35**(3 Pt 2): 849-857.
- Güntert, P. (2003). "Automated NMR protein structure calculation." *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **43**: 105-125.
- Güntert, P., C. Mumenthaler and K. Wüthrich (1997). "Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA." *J Mol Biol* **273**(1): 283-298.
- Hadley, K., M. Borrelli, J. Lepock, J. McLaurin, S. Croul, A. Guha and A. Chakrabartty (2011). "Multiphoton ANS fluorescence microscopy as an in vivo sensor for protein misfolding stress." *Cell Stress and Chaperones* **16**(5): 549-561.
- Haider, S. R., H. J. Reid and B. L. Sharp (2012). "Tricine-SDS-PAGE." *Methods Mol Biol* **869**: 81-91.
- Haldane, J. B. S. (1929). "The origin of life." *The Rationalist Annual* **148**: 3-10.
- Halfmann, R., D. F. Jarosz, S. K. Jones, A. Chang, A. K. Lancaster and S. Lindquist (2012). "Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts." *Nature* **482**(7385): 363-368.
- Handa, V., H. J. Yeh, P. McPhie and K. Usdin (2005). "The AUUCU repeats responsible for spinocerebellar ataxia type 10 form unusual RNA hairpins." *J Biol Chem* **280**(32): 29340-29345.
- Harris, N. L., S. R. Presnell and F. E. Cohen (1994). "Four helix bundle diversity in globular proteins." *J Mol Biol* **236**(5): 1356-1368.
- Hennet, R. J., N. G. Holm and M. H. Engel (1992). "Abiotic synthesis of amino acids under hydrothermal conditions and the origin of life: a perpetual phenomenon?" *Naturwissenschaften* **79**(8): 361-365.
- Higgs, P. G. and R. E. Pudritz (2009). "A thermodynamic basis for prebiotic amino acid synthesis and the nature of the first genetic code." *Astrobiology* **9**(5): 483-490.
- Hill, R. B. and W. F. DeGrado (1998). "Solution Structure of alpha2D, a Nativelike de Novo Designed Protein." *Journal of the American Chemical Society* **120**(6): 1138-1145.
- Hirano, A., H. Hamada, T. Okubo, T. Noguchi, H. Higashibata and K. Shiraki (2007). "Correlation Between Thermal Aggregation and Stability of Lysozyme with Salts Described by Molar Surface Tension Increment: An Exceptional Propensity of Ammonium Salts as Aggregation Suppressor." *The Protein Journal* **26**(6): 423-433.

- Hirst, J. D. (1998). "Improving protein circular dichroism calculations in the far-ultraviolet through reparametrizing the amide chromophore." *J Chem Phys* **109**(2): 782-788.
- Hodel, A. E., P. D. Gershon, X. Shi, S. M. Wang and F. A. Quiocho (1997). "Specific protein recognition of an mRNA cap through its alkylated base." *Nat Struct Biol* **4**(5): 350-354.
- Hof, M. (2003). Basics of Optical Spectroscopy. *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 37-47.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **24**(4): 247-260.
- Hong, M. and Y. Su (2011). "Structure and dynamics of cationic membrane peptides and proteins: insights from solid-state NMR." *Protein Sci* **20**(4): 641-655.
- Hooke, R. (1665). *Micrographia: or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*. London, J. Martyn and J. Allestry.
- Huber, C. and G. Wachtershauser (2006). "alpha-Hydroxy and alpha-amino acids under possible Hadean, volcanic origin-of-life conditions." *Science* **314**(5799): 630-632.
- Hung, S. H., Q. Yu, D. M. Gray and R. L. Ratliff (1994). "Evidence from CD spectra that d(purine).r(pyrimidine) and r(purine).d(pyrimidine) hybrids are in different structural classes." *Nucleic Acids Res* **22**(20): 4326-4334.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1994). "A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins." *Protein Sci* **3**(12): 2207-2216.
- Hvidt, A. and S. O. Nielsen (1966). "Hydrogen exchange in proteins." *Adv Protein Chem* **21**: 287-386.
- Illangasekare, M. and M. Yarus (1999). "A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis." *RNA* **5**(11): 1482-1489.
- Issac, R. and J. Chmielewski (2002). "Approaching exponential growth with a self-replicating peptide." *J Am Chem Soc* **124**(24): 6808-6809.
- Issac, R., Y. W. Ham and J. Chmielewski (2001). "The design of self-replicating helical peptides." *Curr Opin Struct Biol* **11**(4): 458-463.
- Johnson, A. P., H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano and J. L. Bada (2008). "The Miller volcanic spark discharge experiment." *Science* **322**(5900): 404.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein (1983). "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water." *J Chem Phys* **79**(2): 926-935.
- Kamtekar, S. and M. H. Hecht (1995). "Protein Motifs. 7. The four-helix bundle: what determines a fold?" *The FASEB Journal* **9**(11): 1013-1022.
- Karberg, M., H. Guo, J. Zhong, R. Coon, J. Perutka and A. M. Lambowitz (2001). "Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria." *Nat Biotechnol* **19**(12): 1162-1167.
- Kashiwagi, N., H. Furuta and Y. Ikawa (2009). "Primitive templated catalysis of a peptide ligation by self-folding RNAs." *Nucleic Acids Res* **37**(8): 2574-2583.
- Kawamura, K., M. Nagahama and K. Kuranoue (2005). "Chemical evolution of RNA under hydrothermal conditions and the role of thermal copolymers of amino acids for the prebiotic degradation and formation of RNA." *Adv Space Res* **35**(9): 1626-1633.
- Kawamura, K., H. Takeya, T. Kushibe and Y. Koizumi (2011). "Mineral-Enhanced Hydrothermal Oligopeptide Formation at the Second Time Scale." *Astrobiology*.
- Kelly, S. M., T. J. Jess and N. C. Price (2005). "How to study proteins by circular dichroism." *Biochim Biophys Acta* **1751**(2): 119-139.
- Kennedy, W. P., J. R. Momand and Y. W. Yin (2007). "Mechanism for de novo RNA synthesis and initiating nucleotide specificity by t7 RNA polymerase." *J Mol Biol* **370**(2): 256-268.
- Kerenyi, L. and F. Gallyas (1973). "[Errors in quantitative estimations on agar electrophoresis using silver stain]." *Clin Chim Acta* **47**(3): 425-436.

- Kier, B. L., I. Shu, L. A. Eidenschink and N. H. Andersen (2010). "Stabilizing capping motif for beta-hairpins and sheets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(23): 10466-10471.
- Kleist, H. (1972). "[Electrophoresis of native serum albumin and albumin preparations in urea-agar-gel]." *Z Med Labortech* **13**(5): 319-324.
- Koculi, E., C. Hyeon, D. Thirumalai and S. A. Woodson (2007). "Charge density of divalent metal cations determines RNA stability." *J Am Chem Soc* **129**(9): 2676-2682.
- Kohlrausch, F. (1897). "Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen." *Annalen der Physik* **298**(10): 209-239.
- Koller, A. N., H. Schwalbe and H. Gohlke (2008). "Starting structure dependence of NMR order parameters derived from MD simulations: implications for judging force-field quality." *Biophys J* **95**(1): L04-06.
- Kollman, P., J. W. Caldwell, W. S. Ross, D. A. Pearlman, D. A. Case, S. DeBolt, T. E. Cheatham, D. Ferguson and G. Seibel (2002). AMBER: A Program for Simulation of Biological and Organic Molecules. *Encyclopedia of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Koradi, R., M. Billeter and K. Wuthrich (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." *J Mol Graph* **14**(1): 51-55, 29-32.
- Kovalev, N. A., D. A. Medvedeva, M. A. Zenkova and V. V. Vlassov (2008). "Cleavage of RNA by an amphiphilic compound lacking traditional catalytic groups." *Bioorg Chem* **36**(2): 33-45.
- Krissinel, E. and K. Henrick (2004). "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2256-2268.
- Kruger, K., P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech (1982). "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." *Cell* **31**(1): 147-157.
- Kubitschek, H. E. and M. L. Freedman (1971). "Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B-r." *J Bacteriol* **107**(1): 95-99.
- Kunz, W., J. Henle and B. W. Ninham (2004). "'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **9**(1-2): 19-37.
- Kurland, C. G. (2010). "The RNA dreamtime: modern cells feature proteins that might have supported a prebiotic polypeptide world but nothing indicates that RNA world ever was." *Bioessays* **32**(10): 866-871.
- Kypr, J., I. Kejnovska, D. Renciuik and M. Vorlickova (2009). "Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA." *Nucleic Acids Res* **37**(6): 1713-1725.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Springer.
- Lambert, J. F. (2008). "Adsorption and polymerization of amino acids on mineral surfaces: a review." *Orig Life Evol Biosph* **38**(3): 211-242.
- Lane, D., P. Prentki and M. Chandler (1992). "Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions." *Microbiol Rev* **56**(4): 509-528.
- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, M. W. MacArthur, R. Kaptein and J. M. Thornton (1996). "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR." *J Biomol NMR* **8**(4): 477-486.
- Laurents, D. V., P. M. Gorman, M. Guo, M. Rico, A. Chakrabarty and M. Bruix (2004). "Alzheimer's Abeta 40 studied by NMR at low pH reveals that DSS binds and promotes beta-ball oligomerization." *Journal of Biological Chemistry*: M409507200.
- Lazinski, D., E. Grzadzińska and A. Das (1989). "Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif." *Cell* **59**(1): 207-218.

- Lee, D. H., J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin and M. R. Ghadri (1996). "A self-replicating peptide." *Nature* **382**(6591): 525-528.
- Levitt, M. (2001). "The birth of computational structural biology." *Nat Struct Biol* **8**(5): 392-393.
- Levitt, M. H. (2008). *Spin dynamics : basics of nuclear magnetic resonance*. Chichester, England ; Hoboken, NJ, John Wiley & Sons.
- Lewandowska, A., S. Oldziej, A. Liwo and H. A. Scheraga (2010). "beta-hairpin-forming peptides; models of early stages of protein folding." *Biophys Chem* **151**(1-2): 1-9.
- Li, Y., E. Wang and Y. Wang (1999). "A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase." *Protein Expr Purif* **16**(2): 355-358.
- Lian, L.-Y. and G. C. K. Roberts (2011). *Protein NMR spectroscopy : practical techniques and applications*. Chichester, West Sussex, Wiley.
- Lim, W. K., J. Rosgen and S. W. Englander (2009). "Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2595-2600.
- Lohman, T. M., P. L. deHaseth and M. T. Record, Jr. (1980). "Pentalysine-deoxyribonucleic acid interactions: a model for the general effects of ion concentrations on the interactions of proteins with nucleic acids." *Biochemistry* **19**(15): 3522-3530.
- Longo, L. M. and M. Blaber (2012). "Protein design at the interface of the pre-biotic and biotic worlds." *Arch Biochem Biophys* **526**(1): 16-21.
- López-Alonso, J. P., M. A. Pardo-Cea, I. Gómez-Pinto, I. Fernández, A. Chakrabartty, E. Pedroso, C. González and D. V. Laurents (2010). "Putative one-pot prebiotic polypeptides with ribonucleolytic activity." *Chemistry* **16**(18): 5314-5323.
- López-Méndez, B. and P. Güntert (2006). "Automated protein structure determination from NMR spectra." *J Am Chem Soc* **128**(40): 13112-13122.
- López de la Osa, J., D. A. Bateman, S. Ho, C. González, A. Chakrabartty and D. V. Laurents (2007). "Getting specificity from simplicity in putative proteins from the prebiotic earth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(38): 14941-14946.
- Macindoe, G., L. Mavridis, V. Venkatraman, M. D. Devignes and D. W. Ritchie (2010). "HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors." *Nucleic Acids Res* **38**(Web Server issue): W445-449.
- Mahoney, M. W. and W. L. Jorgensen (2000). "A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions." *J Chem Phys* **112**(20): 8910-8922.
- Markley, J. L., A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright and K. Wuthrich (1998). "Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids--IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy." *Eur J Biochem* **256**(1): 1-15.
- Marshall, W. L. (1994). "Hydrothermal synthesis of amino acids." *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**(9): 2099-2106.
- Mascotti, D. P. and T. M. Lohman (1997). "Thermodynamics of oligoarginines binding to RNA and DNA." *Biochemistry* **36**(23): 7272-7279.
- Mason, P. E., G. W. Neilson, J. E. Enderby, M. L. Sabounji, C. E. Dempsey, A. D. MacKerell, Jr. and J. W. Brady (2004). "The structure of aqueous guanidinium chloride solutions." *J Am Chem Soc* **126**(37): 11462-11470.
- Matsumura, S., T. Takahashi, A. Ueno and H. Mihara (2003). "Complementary nucleobase interaction enhances peptide-peptide recognition and self-replicating catalysis." *Chemistry* **9**(19): 4829-4837.

- Matsuo, H., H. Li, A. M. McGuire, C. M. Fletcher, A. C. Gingras, N. Sonenberg and G. Wagner (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." *Nat Struct Biol* **4**(9): 717-724.
- Maury, C. P. (2009). "Self-propagating beta-sheet polypeptide structures as prebiotic informational molecular entities: the amyloid world." *Orig Life Evol Biosph* **39**(2): 141-150.
- McCammon, J. A., B. R. Gelin and M. Karplus (1977). "Dynamics of folded proteins." *Nature* **267**(5612): 585-590.
- McDonald, G. D. and M. C. Storrie-Lombardi (2010). "Biochemical constraints in a protobiotic earth devoid of basic amino acids: the "BAA(-) world". " *Astrobiology* **10**(10): 989-1000.
- Melander, W. and C. Horvath (1977). "Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series." *Arch Biochem Biophys* **183**(1): 200-215.
- Menendez-Arias, L. and P. Argos (1989). "Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in alpha-helices." *J Mol Biol* **206**(2): 397-406.
- Meyer, T. S. and B. L. Lamberts (1965). "Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips." *Biochim Biophys Acta* **107**(1): 144-145.
- Miller, S. L. (1953). "A production of amino acids under possible primitive earth conditions." *Science* **117**(3046): 528-529.
- Mironova, N. L., D. V. Pyshnyi, D. V. Shtadler, A. A. Fedorova, V. V. Vlassov and M. A. Zenkova (2007). "RNase T1 mimicking artificial ribonuclease." *Nucleic Acids Res* **35**(7): 2356-2367.
- Moffatt, B. A., J. J. Dunn and F. W. Studier (1984). "Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase." *J Mol Biol* **173**(2): 265-269.
- Morozova, N., J. Allers, J. Myers and Y. Shamoo (2006). "Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures." *Bioinformatics* **22**(22): 2746-2752.
- Mrabet, N. T., A. Van den Broeck, I. Van den brande, P. Stanssens, Y. Laroche, A. M. Lambeir, G. Matthijssens, J. Jenkins, M. Chiadmi, H. van Tilbeurgh and et al. (1992). "Arginine residues as stabilizing elements in proteins." *Biochemistry* **31**(8): 2239-2253.
- Ng, A. K., H. Zhang, K. Tan, Z. Li, J. H. Liu, P. K. Chan, S. M. Li, W. Y. Chan, S. W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J. H. Wang and P. C. Shaw (2008). "Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design." *FASEB J* **22**(10): 3638-3647.
- Nielsen, P. E. (2007). "Peptide nucleic acids and the origin of life." *Chem Biodivers* **4**(9): 1996-2002.
- Okuyama, M., H. Laman, S. R. Kingsbury, C. Visintin, E. Leo, K. L. Eward, K. Stoeber, C. Boshoff, G. H. Williams and D. L. Selwood (2007). "Small-molecule mimics of an alpha-helix for efficient transport of proteins into cells." *Nat Methods* **4**(2): 153-159.
- Oladepo, S. A., K. Xiong, Z. Hong and S. A. Asher (2011). "Elucidating Peptide and Protein Structure and Dynamics: UV Resonance Raman Spectroscopy." *J Phys Chem Lett* **2**(4): 334-344.
- Oparin, A. I. (1924). "Proiskhozhdenie Zhizny." *Mockba: Moscovskii Rabotchii*.
- Orgel, L. E. (1968). "Evolution of the genetic apparatus." *J Mol Biol* **38**(3): 381-393.
- Ornstein, L. (1964). "Disc Electrophoresis. I. Background and Theory." *Ann N Y Acad Sci* **121**: 321-349.
- Oro, J. (1961). "Mechanism of synthesis of adenine from hydrogen cyanide under possible primitive earth conditions." *Nature* **191**: 1193-1194.
- Pantoja-Uceda, D., J. L. Arolas, F. X. Aviles, J. Santoro, S. Ventura and C. P. Sommerhoff (2009). "Deciphering the structural basis that guides the oxidative folding of leech-derived tryptase inhibitor." *J Biol Chem* **284**(51): 35612-35620.



- Pantoja-Uceda, D., C. M. Santiveri and M. A. Jiménez (2006). "De novo design of monomeric beta-hairpin and beta-sheet peptides." *Methods Mol Biol* **340**: 27-51.
- Parker, E. T., H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, M. Callahan, A. Aubrey, A. Lazcano and J. L. Bada (2011). "Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller H<sub>2</sub>S-rich spark discharge experiment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(14): 5526-5531.
- Perczel, A. and G. D. Fasman (1992). "Quantitative analysis of cyclic beta-turn models." *Protein Sci* **1**(3): 378-395.
- Perez-Canadillas, J. M. and G. Varani (2001). "Recent advances in RNA-protein recognition." *Curr Opin Struct Biol* **11**(1): 53-58.
- Perez-Cano, L. and J. Fernandez-Recio (2010). "Optimal protein-RNA area, OPRA: a propensity-based method to identify RNA-binding sites on proteins." *Proteins* **78**(1): 25-35.
- Pizzarello, S. (2007). "The chemistry that preceded life's origin: a study guide from meteorites." *Chem Biodivers* **4**(4): 680-693.
- Plankensteiner, K., H. Reiner and B. M. Rode (2006). "Amino acids on the rampant primordial Earth: electric discharges and the hot salty ocean." *Mol Divers* **10**(1): 3-7.
- Podlech, J. (2001). "Origin of organic molecules and biomolecular homochirality." *Cell Mol Life Sci* **58**(1): 44-60.
- Popa, L. M. and L. Bosch (1969). "Ribonucleic acid toluidine blue complexes studied by gel electrophoresis and spectrophotometry." *FEBS Lett* **4**(3): 143-146.
- Powner, M. W., B. Gerland and J. D. Sutherland (2009). "Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions." *Nature* **459**(7244): 239-242.
- Powner, M. W., J. D. Sutherland and J. W. Szostak (2010). "Chemoselective multicomponent one-pot assembly of purine precursors in water." *J Am Chem Soc* **132**(46): 16677-16688.
- Prompers, J. J. and R. Bruschweiler (2002). "General framework for studying the dynamics of folded and unfolded proteins by NMR relaxation spectroscopy and MD simulation." *J Am Chem Soc* **124**(16): 4522-4534.
- Rahman, A. (1964). "Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon." *Physical Review* **136**(2A): A405-A411.
- Raymond, S., M. Nakamichi and B. Aurell (1962). "Acrylamide gel as an electrophoresis medium." *Nature* **195**: 697-698.
- Raymond, S. and L. Weintraub (1959). "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis." *Science* **130**(3377): 711.
- Reiner, H., K. Plankensteiner, D. Fitz and B. M. Rode (2006). "The possible influence of L-histidine on the origin of the first peptides on the primordial Earth." *Chem Biodivers* **3**(6): 611-621.
- Richardson, D. C. and J. S. Richardson (1992). "The kinemage: a tool for scientific communication." *Protein Sci* **1**(1): 3-9.
- Rode, B. M., D. Fitz and T. Jakschitz (2007). "The first steps of chemical evolution towards the origin of life." *Chem Biodivers* **4**(12): 2674-2702.
- Rosenmann, H., D. Blum, R. Kaye and L. M. Ittner (2012). "Tau protein: function and pathology." *Int J Alzheimers Dis* **2012**: 707482.
- Roth, A. and R. R. Breaker (1998). "An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(11): 6027-6031.
- Rughani, R. V. and J. P. Schneider (2008). "Molecular Design of beta-Hairpin Peptides for Material Construction." *MRS Bull* **33**(5): 530-535.
- Sabbioni, G. (1994). "Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships." *Environ Health Perspect* **102 Suppl 6**: 61-67.
- Saladino, R., C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo and E. Di Mauro (2011). "Formamide and the origin of life." *Phys Life Rev.*

- Sanchez, R. A., J. P. Ferris and L. E. Orgel (1967). "Studies in prebiotic synthesis. II. Synthesis of purine precursors and amino acids from aqueous hydrogen cyanide." J Mol Biol **30**(2): 223-253.
- Santiveri, C. M. and M. A. Jimenez (2010). "Tryptophan residues: scarce in proteins but strong stabilizers of beta-hairpin peptides." Biopolymers **94**(6): 779-790.
- Santiveri, C. M., M. J. Perez de Vega, R. Gonzalez-Muniz and M. A. Jimenez (2011). "Trp-Trp pairs as beta-hairpin stabilisers: hydrogen-bonded versus non-hydrogen-bonded sites." Org Biomol Chem **9**(15): 5487-5492.
- Santiveri, C. M., J. Santoro, M. Rico and M. A. Jimenez (2004). "Factors involved in the stability of isolated beta-sheets: Turn sequence, beta-sheet twisting, and hydrophobic surface burial." Protein Sci **13**(4): 1134-1147.
- Scott, J. N., N. V. Nucci and J. M. Vanderkooi (2008). "Changes in water structure induced by the guanidinium cation and implications for protein denaturation." J Phys Chem A **112**(43): 10939-10948.
- Schafmeister, C. E., S. L. LaPorte, L. J. Miercke and R. M. Stroud (1997). "A designed four helix bundle protein with native-like structure." Nat Struct Biol **4**(12): 1039-1046.
- Schagger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc **1**(1): 16-22.
- Schidlowski, M. (1988). "A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks." Nature **333**(6171): 313-318.
- Schwarzinger, S., G. J. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright and H. J. Dyson (2001). "Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts." J Am Chem Soc **123**(13): 2970-2978.
- Segre, D., D. Ben-Eli, D. W. Deamer and D. Lancet (2001). "The lipid world." Orig Life Evol Biosph **31**(1-2): 119-145.
- Segre, D. and D. Lancet (2000). "Composing life." EMBO Rep **1**(3): 217-222.
- Semisotnov, G. V., N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas and R. I. Gilmanishin (1991). "Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe." Biopolymers **31**(1): 119-128.
- Severin, K., D. H. Lee, J. A. Martinez and M. R. Ghadiri (1997). "Peptide Self-Replication Via Template-Directed Ligation." Chemistry – A European Journal **3**(7): 1017-1024.
- Sharma, Y., C. M. Rao, S. C. Rao, A. G. Krishna, T. Somasundaram and D. Balasubramanian (1989). "Binding site conformation dictates the color of the dye stains-all. A study of the binding of this dye to the eye lens proteins crystallins." J Biol Chem **264**(35): 20923-20927.
- Shen, Y. and A. Bax (2012). "Identification of helix capping and b-turn motifs from NMR chemical shifts." J Biomol NMR **52**(3): 211-232.
- Shen, Y., F. Delaglio, G. Cornilescu and A. Bax (2009). "TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts." J Biomol NMR **44**(4): 213-223.
- Shimizu, A., M. Ikeguchi and S. Sugai (1994). "Appropriateness of DSS and TSP as internal references for  $^1\text{H}$  NMR studies of molten globule proteins in aqueous media." Journal of Biomolecular NMR **4**(6): 859-862.
- Sidorova, N. Y., S. Hung and D. C. Rau (2010). "Stabilizing labile DNA-protein complexes in polyacrylamide gels." Electrophoresis **31**(4): 648-653.
- Simpson, R. J. (2006). "Electrophoresis of Peptides (Tricine-SDS-PAGE)." CSH Protoc **2006**(1).
- Slutsky, M. M. and E. N. Marsh (2004). "Cation- $\pi$  interactions studied in a model coiled-coil peptide." Protein Sci **13**(8): 2244-2251.
- Stanger, H. E., F. A. Syud, J. F. Espinosa, I. Gariat, T. Muir and S. H. Gellman (2001). "Length-dependent stability and strand length limits in antiparallel beta -sheet secondary structure." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12015-12020.
- Steitz, T. A. (2009). "The structural changes of T7 RNA polymerase from transcription initiation to elongation." Curr Opin Struct Biol **19**(6): 683-690.

- Stewart, A. L. and M. L. Waters (2009). "Structural effects on ss- and dsDNA recognition by a beta-hairpin peptide." *ChemBiochem* **10**(3): 539-544.
- Subbiah, S., D. V. Laurents and M. Levitt (1993). "Structural similarity of DNA-binding domains of bacteriophage repressors and the globin core." *Curr Biol* **3**(3): 141-148.
- Subramanya, H. S., A. J. Doherty, S. R. Ashford and D. B. Wigley (1996). "Crystal structure of an ATP-dependent DNA ligase from bacteriophage T7." *Cell* **85**(4): 607-615.
- Sundlass, N. K. and R. T. Raines (2011). "Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of onconase." *Biochemistry* **50**(47): 10293-10299.
- Szathmary, E. (1999). "The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world." *Trends Genet* **15**(6): 223-229.
- Tamura, K. and P. Schimmel (2003). "Peptide synthesis with a template-like RNA guide and aminoacyl phosphate adaptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8666-8669.
- Tatko, C. D. and M. L. Waters (2004). "Comparison of C-H...pi and hydrophobic interactions in a beta-hairpin peptide: impact on stability and specificity." *J Am Chem Soc* **126**(7): 2028-2034.
- Tina, K. G., R. Bhadra and N. Srinivasan (2007). "PIC: Protein Interactions Calculator." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W473-476.
- Toennies, G. and D. L. Gallant (1949). "The relation between photometric turbidity and bacterial concentration." *Growth* **13**(1): 7-20.
- Tomoo, K., X. Shen, K. Okabe, Y. Nozoe, S. Fukuhara, S. Morino, T. Ishida, T. Taniguchi, H. Hasegawa, A. Terashima, M. Sasaki, Y. Katsuya, K. Kitamura, H. Miyoshi, M. Ishikawa and K. Miura (2002). "Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region." *Biochem J* **362**(Pt 3): 539-544.
- Trifonov, E. N. (2000). "Consensus temporal order of amino acids and evolution of the triplet code." *Gene* **261**(1): 139-151.
- Turk, R. M., N. V. Chumachenko and M. Yarus (2010). "Multiple translational products from a five-nucleotide ribozyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(10): 4585-4589.
- Ulrich, E. L., H. Akutsu, J. F. Doreleijers, Y. Harano, Y. E. Ioannidis, J. Lin, M. Livny, S. Mading, D. Maziuk, Z. Miller, E. Nakatani, C. F. Schulte, D. E. Tolmie, R. Kent Wenger, H. Yao and J. L. Markley (2008). "BioMagResBank." *Nucleic Acids Res* **36**(Database issue): D402-408.
- Urey, H. C. (1952). "On the Early Chemical History of the Earth and the Origin of Life." *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**(4): 351-363.
- Varani, L., M. Hasegawa, M. G. Spillantini, M. J. Smith, J. R. Murrell, B. Ghetti, A. Klug, M. Goedert and G. Varani (1999). "Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8229-8234.
- Velankar, S., Y. Alhroub, C. Best, S. Caboche, M. J. Conroy, J. M. Dana, M. A. Fernandez Montecelo, G. van Ginkel, A. Golovin, S. P. Gore, A. Gutmanas, P. Haslam, P. M. Hendrickx, E. Heuson, M. Hirshberg, M. John, I. Lagerstedt, S. Mir, L. E. Newman, T. J. Oldfield, A. Patwardhan, L. Rinaldi, G. Sahni, E. Sanz-Garcia, S. Sen, R. Slowley, A. Suarez-Uruena, G. J. Swaminathan, M. F. Symmons, W. F. Vranken, M. Wainwright and G. J. Kleywegt (2012). "PDBe: Protein Data Bank in Europe." *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue): D445-452.
- Vinayak, R., A. Andrus, B. Mullah and D. Tsou (1995). "Advances in the chemical synthesis and purification of RNA." *Nucleic Acids Symp Ser* **33**: 123-125.
- Vranken, W. F., W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides and E. D. Laue (2005). "The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline." *Proteins* **59**(4): 687-696.

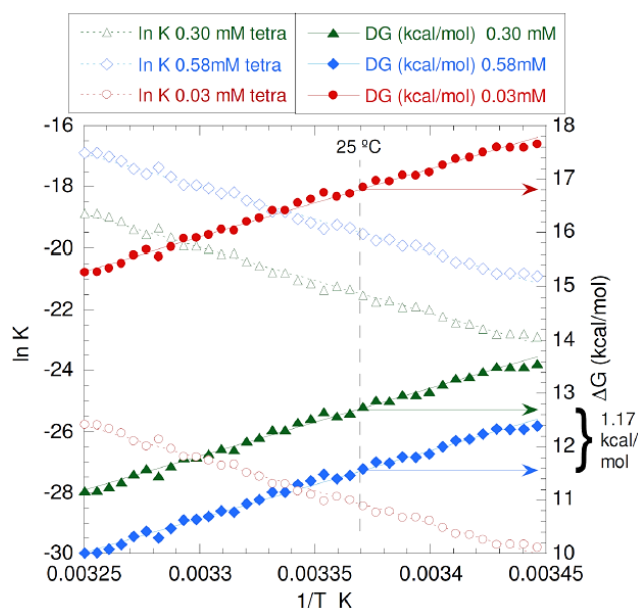
- Wachtershauser, G. (1992). "Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world." *Prog Biophys Mol Biol* **58**(2): 85-201.
- Walrant, A., A. Vogel, I. Correia, O. Lequin, B. E. Olausson, B. Desbat, S. Sagan and I. D. Alves (2012). "Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities." *Biochim Biophys Acta* **1818**(7): 1755-1763.
- Wang, J. and J. A. Feng (2003). "Exploring the sequence patterns in the alpha-helices of proteins." *Protein Eng* **16**(11): 799-807.
- Wang, L., X. He, Y. Bi and Q. Ma (2012). "Stem cell and benzene-induced malignancy and hematotoxicity." *Chem Res Toxicol*.
- Wang, X., X. Song, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2010). "The Long Arm of Long Noncoding RNAs: Roles as Sensors Regulating Gene Transcriptional Programs." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Wang, Y., T. C. Bjorndahl and D. S. Wishart (2000). "Complete <sup>1</sup>H and non-carbonylic <sup>13</sup>C assignments of native hen egg-white lysozyme." *J Biomol NMR* **17**(1): 83-84.
- Weber, A. L. (1992). "Prebiotic sugar synthesis: hexose and hydroxy acid synthesis from glyceraldehyde catalyzed by iron(III) hydroxide oxide." *J Mol Evol* **35**(1): 1-6.
- Weber, G. and L. B. Young (1964). "Fragmentation of Bovine Serum Albumin by Pepsin. I. The Origin of the Acid Expansion of the Albumin Molecule." *J Biol Chem* **239**: 1415-1423.
- Weber, K. and M. Osborn (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* **244**(16): 4406-4412.
- Weiss, M. A. and N. Narayana (1998). "RNA recognition by arginine-rich peptide motifs." *Biopolymers* **48**(2-3): 167-180.
- White, S. H. (1992). "Amino acid preferences of small proteins. Implications for protein stability and evolution." *J Mol Biol* **227**(4): 991-995.
- Williamson, M. P. (1990). "Secondary-structure dependent chemical shifts in proteins." *Biopolymers* **29**(10-11): 1423-1431.
- Willis, M. A., B. Bishop, L. Regan and A. T. Brunger (2000). "Dramatic Structural and Thermodynamic Consequences of Repacking a Protein's Hydrophobic Core." *Structure* **8**(12): 1319-1328.
- Wishart, D. S., B. D. Sykes and F. M. Richards (1991). "Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure." *J Mol Biol* **222**(2): 311-333.
- Wittig, I., T. Beckhaus, Z. Wumaier, M. Karas and H. Schagger (2010). "Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints." *Mol Cell Proteomics* **9**(10): 2149-2161.
- Wochner, A., J. Attwater, A. Coulson and P. Holliger (2011). "Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme." *Science* **332**(6026): 209-212.
- Woods, A. S. and S. Ferre (2005). "Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction." *J Proteome Res* **4**(4): 1397-1402.
- Woody, R. W. and A. Koslowski (2002). "Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides." *Biophys Chem* **101-102**: 535-551.
- Wu, L., D. McElheny, T. Takekiyo and T. A. Keiderling (2010). "Geometry and efficacy of cross-strand Trp/Trp, Trp/Tyr, and Tyr/Tyr aromatic interaction in a beta-hairpin peptide." *Biochemistry* **49**(22): 4705-4714.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of proteins and nucleic acids*. New York, Wiley.
- Yin, Y. W. and T. A. Steitz (2002). "Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase." *Science* **298**(5597): 1387-1395.
- Zaia, D. A., C. T. Zaia and H. De Santana (2008). "Which amino acids should be used in prebiotic chemistry studies?" *Orig Life Evol Biosph* **38**(6): 469-488.
- Zawadzki, V. and H. J. Gross (1991). "Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase." *Nucleic Acids Res* **19**(8): 1948.

Zhang, C., J. Hou and S. H. Kim (2002). "Fold prediction of helical proteins using torsion angle dynamics and predicted restraints." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3581-3585.

## **10. APÉNDICE**



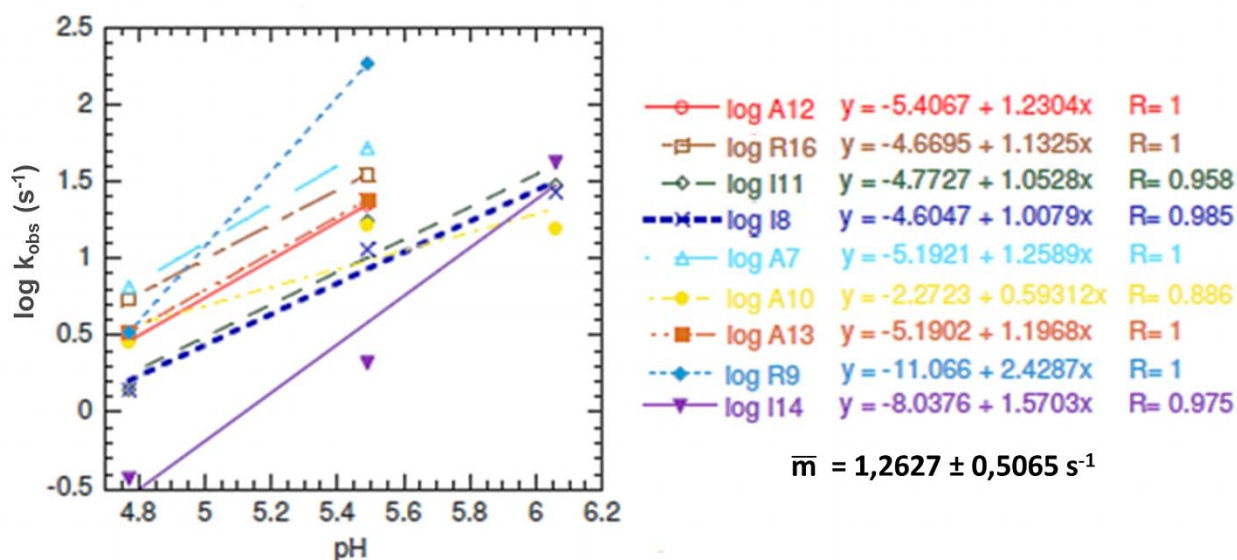
**Apéndice 1.** Gráfico de los valores de  $\Delta G$  y  $\ln K$  en función de la temperatura ( $^{\circ}\text{K}$ ), calculados empleando la expresión de la ecuación 2 (Pág. 45), usando los resultados experimentales de  $F_D$  a diferentes concentraciones de tetrámero: 0,03 mM, la concentración de tetrámero de RIA7 empleada para los experimentos de CD; 0,30 mM y 0,58 mM, las empleadas en los experimentos de intercambio H/D para KIA7Y (López-Alonso et al. 2010) y RIA7, respectivamente. Los valores de  $\ln K$  (eje vertical izquierdo y símbolos vacíos) permitieron calcular la  $\Delta G$  (eje vertical derecho y símbolos con relleno) haciendo uso de la ecuación de Gibbs:  $\Delta G = -RT \ln K$ . A  $25^{\circ}\text{C}$ , la diferencia en la concentración de tetrámeros entre KIA7 y RIA7 en los experimentos de intercambio H/D, corresponde a una diferencia en la energía libre de Gibbs de 1,17 kcal/mol. Este valor concuerda con la diferencia de estabilidad de 1,0 kcal/mol observada en dichos experimentos. Por lo tanto, teniendo en cuenta el efecto de la concentración mencionado, se puede afirmar que los experimentos de intercambio de hidrógeno muestran que la estabilidad de KIA7 y RIA7 es similar. El valor de 16,8 kcal/mol determinado para una concentración tetramérica de RIA7 de 0,03 mM (monomérica de 120  $\mu\text{M}$ ) responde a estas mismas deducciones, correspondiéndose con una  $\Delta G = 18 \pm 2$  kcal/mol calculada para KIA7 en las mismas condiciones experimentales.



Residuo	$^1\text{H}\text{N}; ^{15}\text{N}$	$^1\text{H}\alpha; ^{13}\text{C}\alpha$	$^1\text{H}\beta; ^{13}\text{C}\beta$	$^1\text{H}\gamma_1; ^{13}\text{C}\gamma_1$	$^1\text{H}\gamma_2; ^{13}\text{C}\gamma_2$	$^1\text{H}\delta; ^{13}\text{C}\delta$	$^1\text{H}\epsilon$	$^1\text{H}\eta$
N-Ac-CH <sub>3</sub>		2.16; <b>24.85</b>						
Ala 1	8.38; <b><i>118.8</i></b>	4.29; <b>55.37</b>	1.52; <b>19.20</b>					
Arg 2	8.66; <b><i>126.8</i></b>	4.20; <b>59.00</b>	1.91; <b>30.09</b>		1.79, 1.65; <b>28.03</b>	3.23; <b>43.59</b>	7.29	6.98, 6.52
Ala 3	8.66; <b><i>123.5</i></b>	4.18; <b>54.71</b>	1.49; <b>18.53</b>					
Ala 4	8.27; <b><i>122.2</i></b>	4.04; <b>55.54</b>	1.34; <b>17.87</b>					
Ala 5	8.20; <b><i>118.6</i></b>	3.86; <b>55.36</b>	1.50; <b>18.08</b>					
Ala 6	7.85; <b><i>119.9</i></b>	4.11; <b>55.17</b>	1.52; <b>18.67</b>					
Ala 7	8.17; <b><i>123.3</i></b>	4.25; <b>55.37</b>	1.41; <b>18.20</b>					
Ile 8	8.32; <b><i>117.6</i></b>	3.54; <b>63.55</b>	1.62; <b>36.93</b>	1.12, 0.66; <b>29.38</b>	0.34; <b>18.41</b>	0.39; <b>13.61</b>		
Arg 9	7.82; <b><i>120.0</i></b>	4.01; <b>60.25</b>	1.97, 1.65; <b>28.70</b>		1.90; <b>27.88</b>	3.31, 3.23; <b>43.79</b>	7.40	7.04, 6.60
Ala 10	9.13; <b><i>122.7</i></b>	3.84; <b>55.38</b>	1.52; <b>18.50</b>					
Ile 11	8.41; <b><i>121.6</i></b>	3.56; <b>66.25</b>	1.88; <b>38.61</b>	2.23, 0.90; <b>30.54</b>	0.80; <b>17.46</b>	0.71; <b>14.24</b>		
Ala 12	7.91; <b><i>122.1</i></b>	4.18; <b>55.62</b>	1.57; <b>18.36</b>					
Ala 13	7.96; <b><i>119.2</i></b>	4.25; <b>55.04</b>	1.60; <b>18.09</b>					
Ile 14	7.97; <b><i>124.0</i></b>	3.94; <b>65.15</b>	2.35; <b>38.71</b>	1.72, 1.26; <b>29.42</b>	0.96; <b>17.35</b>	0.67; <b>15.18</b>		
Ile 15	7.40; <b><i>119.8</i></b>	3.78; <b>62.41</b>	2.07; <b>36.55</b>	1.76, 1.19; <b>28.30</b>	1.02; <b>18.20</b>	0.82; <b>10.74</b>		
Arg 16	8.65; <b><i>130.6</i></b>	4.15; <b>59.40</b>	1.97, 1.88; <b>30.56</b>		1.77; <b>27.93</b>	3.25; <b>43.79</b>	7.34	7.00, 6.60
Ala 17	8.41; <b><i>121.6</i></b>	4.15; <b>55.04</b>	1.52; <b>18.38</b>					
Gly 18	7.57; <b><i>100.4</i></b>	4.09, 3.44; <b>44.95</b>						
Gly 19	7.62; <b><i>106.1</i></b>	3.82; <b>45.91</b>						
Tyr 20	7.62; <b><i>117.0</i></b>	4.46; <b>57.91</b>	3.12, 2.74; <b>39.49</b>			7.12	6.70	9.34
C-NH <sub>2</sub>	7.85, 7.18; <b><i>106.5</i></b>							

**Apéndice 2.** Tabla en la que se resumen los  $\delta$  (ppm) encontrados para los diferentes átomos asignados manualmente durante los experimentos de espectroscopia de RMN realizados para RIA7 en 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O y tampón H/NaAc 10 mM a pH 4.5 y  $5^{\circ}\text{C}$ , con DSS 50  $\mu\text{M}$ . Los valores en negrita molde se corresponden con las señales detectadas para  $^{13}\text{C}$  y los valores en negrita cursiva con los observados para  $^{15}\text{N}$ . La desviación estándar para todos los residuos asignados es menor de 0.01 ppm.

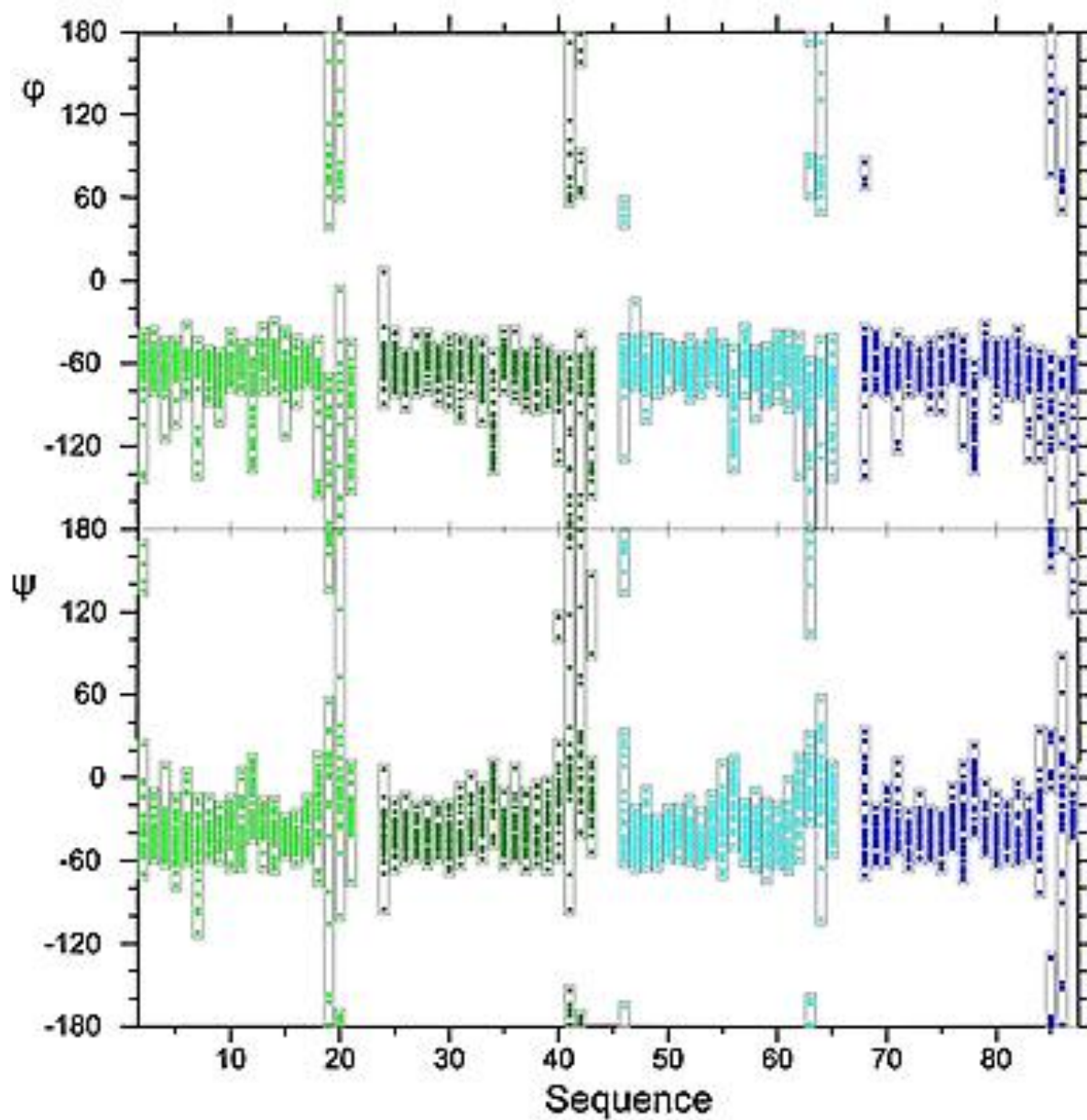




**Apéndice 3.** Gráfico representativo de los valores de intercambio obtenidos para los diferentes protones amídicos cuya señal fue integrada con respecto a la señal de  $^1\text{H}\epsilon$  de Tyr 20, que no se veía afectada por la presencia del  $\text{D}_2\text{O}$ . En caso de que el proceso de intercambio mostrase un mecanismo descrito como de tipo EXII (usualmente para valores de pH bajos y proteínas estables), la velocidad de intercambio H/D dependería de la concentración de iones  $\text{OH}^-$  presente en el medio, a diferencia de lo que ocurre en un mecanismo de tipo EXI (observado a valores de  $\text{pH} > 10$  o menores si la proteína es poco estable), donde la velocidad de intercambio viene limitada por la velocidad de desplegamiento de la proteína. Según esto, mediante el cálculo de la velocidad de intercambio observada ( $k_{\text{obs}}$ ), usando una ecuación exponencial, y recurriendo a una representación gráfica del  $\log K_{\text{obs}}$  respecto al pH, podemos ver que en la mayoría de los casos la pendiente de las rectas obtenidas es aproximadamente 1. Esto quiere decir que la velocidad de intercambio es directamente proporcional a la concentración de iones hidroxilo del medio, o lo que es lo mismo, la velocidad de intercambio aumenta 10 veces por cada unidad de pH, tal y como describe el modelo EXII. Una vez demostrado el comportamiento de RIA7 en este tipo de ensayos, pudimos calcular con total seguridad la energía libre conformacional ( $\Delta G$ ) del péptido y así conocer su estabilidad a partir de los datos de intercambio.

Residuo	$^1\text{HN}; ^{15}\text{N}$	$^1\text{Ha}; ^{13}\text{Ca}$	$^1\text{H}\beta; ^{13}\text{C}\beta$	$^1\text{H}\gamma_{12,13}; ^{13}\text{C}\gamma_1$	$^1\text{H}\gamma_2; ^{13}\text{C}\gamma_2$	$^1\text{H}\delta; ^{13}\text{C}\delta$	$^1\text{H}\epsilon; ^{13}\text{C}\epsilon$	$^1\text{H}\zeta$
<b>General</b>								
Ala (helicoidal)		4.14; <b>54.8</b>	1.46; <b>18.2</b>					
Ala (no helicoidal)		4.28; <b>52.3</b>	1.39; <b>19.1</b>					
Gly		4.00; <b>45.1</b>						
Ile		4.16; <b>60.8</b>	1.90; <b>38.5</b>	1.48, 1.15; <b>27.2</b>	0.94; <b>17.5</b>	0.87; <b>12.9</b>		
<b>Específico</b>								
N-Ac-CH <sub>3</sub>		2.13; <b>24.6</b>						
Ala 1	8.67; <b>130.7</b>	4.17; <b>54.7</b>	1.48; <b>18.1</b>					
Lys 2	8.68; <b>119.4</b>	4.16; <b>57.7</b>	1.87; <b>32.1</b>	1.58; <b>25.4</b>		1.72; <b>29.1</b>	2.99; <b>41.8</b>	7.62
Ala 3	8.34	4.10; <b>53.7</b>	1.43; <b>18.5</b>					
Lys 9		4.15; <b>58.7</b>	1.90; <b>32.6</b>	1.51; <b>24.9</b>		1.71; <b>29.1</b>	2.99; <b>41.8</b>	7.62
Lys 16	8.54	4.29; <b>56.0</b>	1.83; <b>32.9</b>	1.41; <b>24.9</b>			2.99; <b>41.8</b>	7.62
Gly 19	8.04; <b>108.0</b>	3.96; <b>45.1</b>						
Ile 20	7.83; <b>118.7</b>	4.13; <b>60.8</b>	1.89; <b>38.5</b>		0.85; <b>17.4</b>			
C-NH <sub>2</sub>	7.74, 7.20; <b>110.9</b>							

**Apéndice 4.** Tabla resumen en la que se recogen desplazamientos químicos (ppm) observados para KIA7I en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 M, en 90%  $\text{H}_2\text{O}$ /10%  $\text{D}_2\text{O}$  y tampón D/NaAc 10 mM a pH 5 y 5 °C, además de los valores representativos (Generales) de Ala, Gly e Ile. Los valores correspondientes a los  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  se muestran en **negrita molde** y **negrita cursiva**, respectivamente. La identificación en algunos átomos de las Lys se basa en la asignación parcial para los átomos de Lys 9, ya que existe una alta probabilidad de que dicho residuo adopte una conformación helicoidal, mientras que en el caso de Lys 2 y Lys 16 esta conformación estaría desordenada.



**Apéndice 5.** Representación esquemática del espacio angular  $\phi$  y  $\psi$  ocupado por los residuos de KIA7I en cuatro de los péptidos que componen el tetrámero. Se puede observar que, mientras la mayoría de los aminoácidos adoptan una conformación helicoidal, los esqueletos peptídicos de los segmentos C-terminales, Gly-Gly-Ile-NH<sub>2</sub>, adoptan gran diversidad de disposiciones.

**Apéndice 6.** Tablas en la que se recogen los  $\delta$  (ppm) de los espectros de RMN asignados, en la medida de lo posible, para los péptidos KIA $\beta$  adquiridos en 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O y tampón D/NaAc 10 mM a 5 °C y pH 5, salvo en el caso de los experimentos de KIA $\beta$ W escogidos, que fueron llevados a cabo a pH 6.4 (rojo) y 7 (verde) en 90% H<sub>2</sub>O/10% D<sub>2</sub>O y a pH 9.2 (azul) en 100% D<sub>2</sub>O. Los valores de desplazamiento químico de <sup>13</sup>C figuran en negrita molde y los correspondientes a <sup>15</sup>N se encuentran escritos en negrita cursiva:

Residuo	<sup>1</sup> HN; <sup>15</sup> N	<sup>1</sup> Ha; <sup>13</sup> Ca	<sup>1</sup> H $\beta$ ; <sup>13</sup> C $\beta$	<sup>1</sup> H $\gamma_1$ ; <sup>13</sup> C $\gamma_1$	<sup>1</sup> H $\gamma_2$ ; <sup>13</sup> C $\gamma_2$	<sup>1</sup> H $\delta$ ; <sup>13</sup> C $\delta$	<sup>1</sup> H $\epsilon$ ; <sup>13</sup> C $\epsilon$	Otros
<b>KIA<math>\beta</math>H</b>								
His 1		5.00	3.39; <b>29.1</b>			7.40	8.70	
His 2	9.08; <b><i>122.4</i></b>	4.79	3.21; <b>29.4</b>			7.32	8.65	
Ile 3	8.56; <b><i>124.7</i></b>	4.16; <b>61.1</b>	1.81; <b>38.8</b>	1.46, 1.17; <b>27.2</b>	0.87; <b>17.4</b>	0.87; <b>12.8</b>		
Lys 4	8.60; <b><i>127.2</i></b>	4.34; <b>54.6</b>	1.79; <b>33.2</b>		1.37; <b>24.9</b>	1.71; <b>29.2</b>	3.01; <b>42.1</b>	
Ile 5	8.51; <b><i>124.9</i></b>	4.17; <b>60.8</b>	1.86; <b>38.8</b>	1.48, 1.19; <b>27.2</b>	0.90; <b>17.4</b>	0.89; <b>12.8</b>		
Asp 6	8.65; <b><i>125.5</i></b>	4.68	2.78, 2.75; <b>40.8</b>					
Gly 7	8.51; <b><i>110.2</i></b>	3.98, 3.89; <b>45.4</b>						
Lys 8	8.29; <b><i>120.3</i></b>	4.25; <b>56.4</b>	1.73; <b>32.9</b>		1.33; <b>24.9</b>	1.66; <b>29.1</b>	2.98; <b>42.1</b>	
His 9	8.64; <b><i>119.7</i></b>	4.72	3.27, 3.15; <b>28.8</b>			7.30	8.63	
Ile 10	8.29; <b><i>120.3</i></b>	4.11; <b>61.1</b>	1.80; <b>38.9</b>	1.41, 1.15; <b>27.2</b>	0.82; <b>17.4</b>	0.80; <b>12.8</b>		
Lys 11	8.59; <b><i>124.3</i></b>	4.28; <b>56.4</b>	1.79; <b>33.2</b>		1.41; <b>24.9</b>	1.69; <b>29.3</b>	3.00; <b>42.1</b>	
His 12	7.96; <b><i>123.2</i></b>	4.51; <b>56.7</b>	3.31, 3.12; <b>29.98</b>			7.24	8.63	
<b>KIA<math>\beta</math>F</b>								
His 1		4.23; <b>54.7</b>	3.26; <b>29.8</b>			7.22	8.33	
Phe 2	8.80	4.71; <b>57.6</b>	3.04; <b>39.3</b>					
Ile 3	8.36	4.10; <b>60.2</b>	1.70; <b>39.1</b>	1.42, 1.09; <b>27.0</b>	0.82; <b>17.2</b>	0.82; <b>12.6</b>		
Lys 4	8.46	4.29; <b>55.9</b>	1.76; <b>32.9</b>		1.34; <b>24.6</b>	1.67; <b>28.9</b>	2.93; <b>41.6</b>	
Ile 5	8.54	4.18; <b>60.5</b>	1.84; <b>38.8</b>	1.46, 1.15; <b>27.1</b>	0.88; <b>17.2</b>	0.83; <b>12.6</b>		
Asp 6	8.71	4.58; <b>54.2</b>	2.76, 2.65; <b>41.0</b>					
Gly 7	8.53	3.91, 3.6; <b>45.2</b>						
Lys 8	8.22	4.28; <b>54.2</b>	1.67; <b>32.9</b>		1.29, 1.26; <b>24.6</b>	1.62; <b>28.9</b>	2.94; <b>41.6</b>	
Phe 9	8.37	4.65; <b>57.6</b>	3.08, 3.00; <b>39.7</b>			7.23	7.33	$\zeta$ 7.30
Ile 10	8.16	4.08; <b>60.5</b>	1.75; <b>38.7</b>	1.42; <b>27.0</b>	0.82, 0.76; <b>17.1</b>			
Lys 11	8.46	4.21; <b>56.2</b>	1.80; <b>32.9</b>		1.43; <b>24.6</b>	1.72; <b>28.9</b>	2.99; <b>41.8</b>	
His 12	8.32	4.47; <b>56.7</b>	3.22, 3.07; <b>29.9</b>			7.25	8.56	
<b>KIA<math>\beta</math>W+ATP</b>								
His 1		4.35; <b>56.3</b>	3.25, 3.13; <b>31.2</b>			7.10; <b>120.0</b>	8.09; <b>138.3</b>	
Trp 2	9.03	5.16; <b>57.2</b>	3.14, 2.91; <b>30.9</b>			7.14; <b>127.1</b>	7.25; <b>120.1</b>	$\zeta$ 7.39, 6.92; <b>114.6, 120.1</b> $\eta$ 7.14; <b>124.5</b>
Ile 3	9.39	4.64; <b>60.1</b>	1.66; <b>42.1</b>	1.37, 0.95; <b>27.2</b>	0.80; <b>17.3</b>	0.68; <b>13.7</b>		
Lys 4	8.54	4.33; <b>55.0</b>	1.06, -0.40; <b>31.8</b>		0.43, 0.19; <b>24.7</b>	1.01; <b>29.1</b>	2.30; <b>41.3</b>	
Ile 5	8.86	4.19; <b>59.9</b>	1.67; <b>39.9</b>	1.37, 1.02; <b>26.9</b>	0.81; <b>17.4</b>	0.81; <b>12.4</b>		
Asp 6	9.41	4.26; <b>55.2</b>	2.92, 2.58; <b>39.7</b>					
Gly 7	8.55	4.10, 3.40; <b>45.4</b>						
Lys 8	7.74	4.60; <b>54.5</b>	1.84, 1.73; <b>35.2</b>		1.41; <b>24.7</b>	1.68; <b>29.1</b>	3.03; <b>42.2</b>	
Trp 9	8.74	4.89; <b>57.6</b>	3.08, 3.00; <b>29.8</b>			7.18; <b>127.2</b>	7.28; <b>120.1</b>	$\zeta$ 7.44, 6.94; <b>114.9, 121.9</b> $\eta$ 7.17; <b>124.6</b>
Ile 10	9.67	4.56; <b>59.8</b>	1.88; <b>41.2</b>	1.42, 1.25; <b>27.0</b>	0.82; <b>17.3</b>	0.82; <b>12.9</b>		
Lys 11	8.28	3.76; <b>55.9</b>	1.16, 0.21; <b>32.4</b>		0.65, 0.32; <b>24.5</b>	1.19, 1.09; <b>29.0</b>	2.67; <b>41.9</b>	
His 12	8.41	4.40; <b>56.7</b>	3.05, 2.79; <b>31.3</b>			7.03; <b>119.5</b>	8.25; <b>136.6</b>	
<b>KIA<math>\beta</math>W+GTP</b>								
His 1		4.60	3.42, 3.30			7.33	8.10	
Trp 2		5.12	3.16, 2.98			7.14	10.17, 7.29	$\zeta$ 7.39, 6.88 $\eta$ 7.08
Ile 3	9.28	4.62	1.69	1.38, 0.97	0.80	0.72		
Lys 4	8.44	4.36	1.06, -0.25		0.42, -0.12	1.03	2.32, 2.25	
Ile 5	8.80	4.18	1.66	1.35, 0.99	0.80	0.76		
Asp 6	9.38	4.25	2.90, 2.58					
Gly 7	8.62	4.07, 3.40						
Lys 8	7.69	4.59	1.83, 1.72		1.38	1.70	3.02	
Trp 9	8.69	4.90	3.09, 3.00			7.20	10.04, 7.30	$\zeta$ 7.40, 6.89 $\eta$ 7.17
Ile 10	9.62	4.49	1.83	1.38, 1.21	0.80	0.79		
Lys 11	8.23	3.66	1.16, 0.36		0.57, 0.39	1.23	2.67, 2.62	
His 12	8.55	4.41	3.13, 2.89			6.90	8.06	
ATP $\rightarrow$ <sup>13</sup> C1' 89.46, <sup>13</sup> C2' 77.22, <sup>13</sup> C3' 72.76, <sup>13</sup> C4' 86.32, <sup>13</sup> C5' 67.89, <sup>13</sup> C8 141.6, <sup>1</sup> H1' 5.73, <sup>1</sup> H2' 4.31, <sup>1</sup> H3' 4.42, <sup>1</sup> H4' 4.32, <sup>1</sup> H5' 4.27 y <sup>1</sup> H8 8.05.								
GTP $\rightarrow$ <sup>1</sup> H1' 5.65, <sup>1</sup> H2' 4.28, <sup>1</sup> H3' 4.55, <sup>1</sup> H4' 4.43 y <sup>1</sup> H8 7.87.								

Residuo	$^1\text{HN}; ^{15}\text{N}$	$^1\text{Ha}; ^{13}\text{Ca}$	$^1\text{Hp}; ^{13}\text{Cb}$	$^1\text{H}\gamma_1; ^{13}\text{C}\gamma_1$	$^1\text{H}\gamma_2; ^{13}\text{C}\gamma_2$	$^1\text{H}\delta; ^{13}\text{C}\delta$	$^1\text{He}; ^{13}\text{Ce}$	Otros
<b>KIAβW</b>								
His 1		4.25 4.09; <b>56.0</b> 3.60	3.25, 3.15 3.13, 2.99; <b>32.7</b> 2.75, 2.65			6.60	7.16	
Trp 2	8.89	5.06 5.28; <b>57.0</b> 5.04	3.37, 3.11 3.30, 3.03; <b>31.2</b> 3.11, 2.84			7.21	10.26 10.22	ζ 7.51, 7.12 ζ 7.49 ζ 7.44, 6.89 η 7.28 η 6.99
Ile 3	9.54 9.37	4.60 4.65; <b>60.2</b> 4.45	1.96 1.70; <b>42.0</b> 1.83	1.49, 1.32 1.38, 0.98; <b>27.3</b> 1.33, 1.20	0.89 0.82; <b>17.1</b> 0.70	0.68; <b>13.4</b> 0.65		
Lys 4	8.45 8.45	5.02 4.45; <b>54.9</b> 4.24	1.24, 0.15 1.11, -0.11; <b>31.8</b> 0.99, -0.313		0.60 0.51, -0.06; <b>24.5</b> 0.35, -0.22	1.13 1.04; <b>28.9</b> 0.86	2.42, 2.34 2.25; <b>40.99</b> 2.13, 2.06	ζ 7.70 ζ 7.65
Ile 5	8.87 8.92	4.26 4.23; <b>60.0</b> 4.05	1.75 1.74; <b>39.9</b> 1.59	1.45 1.29	1.10 0.92	0.89 0.70		
Asp 6	9.39 9.42	4.35 4.30; <b>55.1</b> 4.10	2.95, 2.63 2.94, 2.61; <b>39.7</b> 2.77, 2.42					
Gly 7	8.89 8.56	4.11, 3.50 3.98, 3.89; <b>45.3</b> 3.93, 3.24						
Lys 8	7.88 7.83 7.89	4.60 4.61; <b>54.5</b> 4.44	1.88, 1.80 1.86, 1.78; <b>35.0</b> 1.69, 1.60		1.44 1.44; <b>24.5</b> 1.26	1.74 1.73; <b>29.0</b> 1.56	3.07 3.03; <b>42.0</b> 2.87	ζ 7.03
Trp 9	8.72 8.73	5.03 4.72; <b>57.44</b> 4.76	3.22, 3.11 3.20, 3.08; <b>29.8</b> 3.02, 2.90			7.27	10.21 10.18	ζ 7.54, 7.09 ζ 7.50 ζ 7.48, 6.92 η 7.30 η 7.08
Ile 10	9.32 9.63 7.95	4.70 4.61; <b>59.6</b> 4.42	1.76 1.97; <b>40.8</b> 1.46	1.45, 1.06 1.49, 1.35; <b>27.0</b> 1.14, 0.80	0.89 0.87; <b>17.3</b> 0.64	0.79 0.84; <b>12.4</b> 0.42		
Lys 11	8.48 8.50	3.99 3.99; <b>55.9</b> 3.80	1.38, 0.72 1.27, 0.49; <b>32.3</b> 1.17, 0.43		0.82, 0.64 0.77, 0.52; <b>24.4</b> 0.70, 0.26	1.26 1.20, 1.07; <b>28.6</b> 0.89	2.75 2.66; <b>41.62</b> 2.45	ζ 7.36 ζ 7.36
His 12	8.44 8.54 8.29	4.50 4.41; <b>57.2</b> 4.16	3.14, 2.89 3.06, 2.78; <b>31.8</b> 2.92, 2.56			6.41	7.23	

**Apéndice 7.** Tablas con los NOEs establecidos entre los átomos  $^1\text{H}$  de residuos diferentes en el péptido KIA $\beta$ W, sin y con ATP, según el tipo de interacción que se esperaba encontrar entre ellos. La distribución en X de estos mapas de contactos es un indicativo de que la estructura secundaria del péptido adopta una conformación en lámina  $\beta$ :

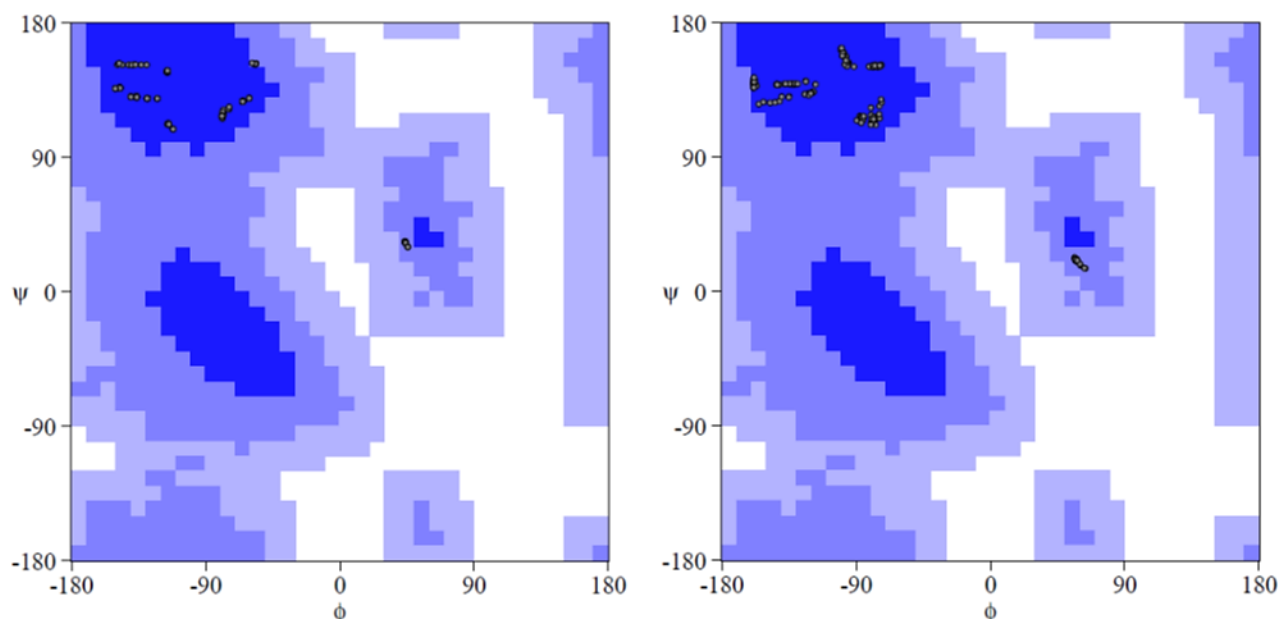
KIA $\beta$ W	His 1	Trp 2	Ile 3	Lys 4	Ile 5	Asp 6	Gly 7	Lys 8	Trp 9	Ile 10	Lys 11	His 12
His 1											$\delta 2-\delta 3$	
Trp 2			$\alpha$ -N $\beta$ -N $\delta 1-\gamma 2$ $\zeta 3-\gamma 2$	$\beta 2-\zeta$ $\zeta 2-\delta 3$ $\zeta 2-\epsilon$ $\zeta 2-\gamma 2$ $\zeta 3-N$ $\zeta 3-\beta$					$\beta 2-\delta 1$ $\beta 2-\zeta 2$ $\delta 1-\beta 2$ $\epsilon 1-\zeta 2$ $\zeta 2-\beta 2$ $\zeta 2-\epsilon 1$	$\zeta 2-N$ $\zeta 2-\delta 1$	$\alpha$ - $\alpha$ $\delta 1-\alpha$ $\epsilon 1-\beta 3$ $\epsilon 1-\delta 2$ $\epsilon 1-\epsilon$ $\zeta 2-N$ $\zeta 2-\alpha$ $\zeta 2-\zeta$	$\alpha$ -N $\zeta 2-\beta 2$
Ile 3		N- $\alpha$ N- $\beta$ $\gamma 2-\delta 1$ $\gamma 2-\zeta 3$		N- $\delta 2$ N- $\zeta$ $\alpha$ -N $\beta$ -N $\gamma 2-N$					N- $\zeta 2$	N-N N- $\beta$ N- $\gamma 2$	N- $\alpha$	
Lys 4		N- $\zeta 3$ $\beta$ - $\zeta 3$ $\gamma 2-\zeta 2$ $\delta 3-\zeta 2$ $\epsilon$ - $\zeta 2$ $\zeta$ - $\beta 2$	N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\gamma 2$ $\delta 2-N$ $\zeta$ -N		$\alpha$ -N $\beta$ -N $\gamma$ -N		$\delta 3-\alpha 3$ $\epsilon$ - $\alpha 3$ $\gamma$ - $\alpha 3$	$\alpha$ -N $\gamma 3-N$	N- $\zeta 2$ $\alpha$ - $\alpha$ $\beta 3-\delta 1$ $\delta 3-\delta 1$ $\delta 3-\epsilon 1$ $\epsilon$ - $\delta 1$ $\epsilon$ - $\epsilon 1$ $\gamma 2-\delta 1$ $\gamma 3-N$ $\gamma$ - $\zeta$	$\alpha$ -N N- $\gamma 2$		
Ile 5				N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\gamma$		$\alpha$ -N $\beta$ - $\beta$ $\delta 1-N$ $\delta 1-\beta$	N-N N-N	N-N N-N	N- $\alpha$			
Asp 6					N- $\alpha$ N- $\delta 1$ $\beta$ - $\beta$ $\beta$ - $\delta 1$		N-N $\alpha$ -N $\beta$ -N	$\alpha$ -N				
Gly 7				$\alpha 3-\delta 3$ $\alpha 3-\epsilon$ $\alpha 3-\gamma$	N-N	N-N N- $\alpha$ N- $\beta$		N-N N- $\alpha$ $\alpha 2-\gamma$				
Lys 8				N- $\alpha$ N- $\gamma 3$	N-N	N- $\alpha$	N-N $\alpha$ -N $\gamma$ - $\alpha 2$		$\alpha$ -N $\beta$ -N $\gamma$ -N			
Trp 9		$\beta 2-\zeta 2$ $\beta 2-\delta 1$ $\epsilon 1-\zeta 2$ $\delta 1-\beta 2$ $\zeta 2-\beta 2$ $\zeta 2-\epsilon 1$	$\zeta 2-N$	N- $\gamma 3$ $\alpha$ - $\alpha$ $\zeta 2-N$ $\delta 1-\beta 3$ $\delta 1-\delta 3$ $\delta 1-\epsilon$ $\delta 1-\gamma 2$ $\epsilon 1-\delta 3$ $\epsilon 1-\epsilon$ $\zeta$ - $\gamma$	$\alpha$ -N			N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\gamma$		$\alpha$ -N $\beta$ -N	$\beta$ - $\zeta$ $\zeta 3-N$	
Ile 10		N- $\zeta 2$ $\delta 1-\zeta 2$	N-N $\beta$ -N $\gamma 2-N$	N- $\alpha$ $\gamma 2-N$					N- $\alpha$ N- $\beta$		$\alpha$ -N $\beta$ -N	$\beta$ - $\epsilon 1$ $\delta 1-\delta 2$ $\delta 1-\epsilon 1$
Lys 11	$\delta 3-\delta 2$	N- $\zeta 2$ $\alpha$ - $\alpha$ $\alpha$ - $\delta 1$ $\alpha$ - $\zeta 2$ $\beta 3-\epsilon 1$ $\delta 2-\epsilon 1$ $\epsilon$ - $\epsilon 1$ $\zeta$ - $\zeta$	$\alpha$ -N						N- $\zeta 3$ $\zeta$ - $\beta$	N- $\alpha$ N- $\beta$		$\alpha$ -N $\alpha$ - $\beta 3$ $\alpha$ - $\delta 2$ $\beta$ -N
His 12		N- $\alpha$ $\beta 2-\zeta 2$								$\epsilon 1-\beta$ $\delta 2-\delta 1$ $\epsilon 1-\delta 1$	N- $\alpha$ N- $\beta$ $\beta 3-\alpha$ $\delta 2-\alpha$	

+ATP	His 1	Trp 2	Ile 3	Lys 4	Ile 5	Asp 6	Gly 7	Lys 8	Trp 9	Ile 10	Lys 11	His 12	ATP
His 1		$\alpha$ -N $\beta$ -N N- $\delta$ 2	$\alpha$ - $\gamma$ 2 $\alpha$ - $\delta$ 1 $\beta$ -N $\beta$ - $\alpha$ $\delta$ 2- $\beta$ $\delta$ 2- $\gamma$ 1	$\delta$ 2- $\gamma$ 2 $\delta$ 2- $\delta$ 1 $\epsilon$ 1- $\beta$ $\epsilon$ 1- $\delta$ 1 $\epsilon$ 1- $\gamma$ 2							$\beta$ - $\alpha$	$\beta$ - $\delta$ 2 $\epsilon$ 1- $\delta$ 2	
Trp 2	N- $\alpha$ N- $\beta$		$\alpha$ -N $\alpha$ - $\beta$ $\alpha$ - $\gamma$ 1 $\alpha$ - $\delta$ 1 $\alpha$ - $\gamma$ 2 $\epsilon$ 3-N	$\epsilon$ 3- $\beta$ $\epsilon$ 3- $\gamma$ 1 $\zeta$ 3-N $\zeta$ 3- $\beta$ $\zeta$ 3- $\gamma$ 1 $\zeta$ 3- $\delta$ 1	$\epsilon$ 3- $\alpha$ $\zeta$ 3-N $\zeta$ 3- $\beta$				N- $\epsilon$ 3 $\alpha$ - $\beta$ 2 $\alpha$ - $\epsilon$ 3 $\beta$ - $\epsilon$ 3 $\beta$ - $\zeta$ $\epsilon$ 3-N $\epsilon$ 3- $\beta$ 3 $\zeta$ - $\beta$	$\epsilon$ 3-N $\alpha$ -N $\alpha$ - $\alpha$ $\alpha$ - $\beta$ $\delta$ 1- $\alpha$ $\delta$ 1- $\epsilon$ $\epsilon$ 1- $\delta$ $\epsilon$ 1- $\epsilon$	$\zeta$ 2- $\delta$ $\zeta$ 2- $\gamma$ $\zeta$ 2- $\epsilon$ $\eta$ 2-N $\eta$ 2- $\beta$ 3 $\eta$ 2- $\delta$ $\eta$ 2- $\epsilon$	$\alpha$ -N $\alpha$ - $\delta$ 2 $\beta$ 2-N	$\beta$ -H8 $\delta$ 1-H8 $\epsilon$ 3-H8 $\zeta$ 2-H8 $\zeta$ 2-H2' $\zeta$ 2-H3' $\eta$ 2-H8 $\eta$ 2-H2' $\eta$ 2-H3'
Ile 3	N- $\beta$ $\alpha$ - $\beta$ $\beta$ - $\delta$ 2 $\beta$ - $\epsilon$ 1 $\gamma$ 1- $\delta$ 2 $\gamma$ 2- $\alpha$ $\gamma$ 2- $\delta$ 2 $\gamma$ 2- $\epsilon$ 1 $\delta$ 1- $\alpha$ $\delta$ 1- $\delta$ 2 $\delta$ 1- $\epsilon$ 1	N- $\alpha$ N- $\epsilon$ 3 N- $\zeta$ 3 $\beta$ - $\alpha$ $\beta$ - $\epsilon$ 3 $\beta$ - $\zeta$ 3	$\gamma$ 1- $\alpha$ $\gamma$ 1- $\epsilon$ 3 $\gamma$ 1- $\zeta$ 3 $\gamma$ 2- $\alpha$ $\delta$ 1- $\alpha$ $\delta$ 1- $\zeta$ 3	$\gamma$ 1-N $\gamma$ 1- $\alpha$						N-N N- $\beta$ N- $\gamma$ 12 $\delta$ 1- $\beta$	N- $\alpha$	$\beta$ - $\delta$ 2 $\gamma$ 1- $\beta$ $\delta$ 1- $\beta$ $\delta$ 1- $\delta$ 2	
Lys 4		N- $\zeta$ 3 $\alpha$ - $\epsilon$ 3 $\beta$ - $\zeta$ 3	N- $\gamma$ 1 $\alpha$ - $\gamma$ 1		$\alpha$ -N $\alpha$ - $\beta$ $\gamma$ -N		$\gamma$ -N $\gamma$ 2- $\alpha$ $\delta$ -N $\delta$ - $\alpha$ 3 $\epsilon$ 2- $\alpha$	$\gamma$ -N $\delta$ -N	$\alpha$ - $\alpha$ $\delta$ - $\delta$ 1 $\delta$ - $\epsilon$ 1 $\epsilon$ - $\delta$ 1 $\epsilon$ - $\epsilon$ 1 $\epsilon$ 3- $\zeta$ 2	$\alpha$ -N N- $\gamma$ 2			
Ile 5				N- $\alpha$ N- $\gamma$ $\beta$ - $\alpha$		$\alpha$ -N $\beta$ - $\beta$ $\beta$ - $\gamma$ 2	$\gamma$ 1- $\alpha$ $\gamma$ 2-N	N-N	N- $\alpha$	N- $\gamma$ 1			
Asp 6					N- $\alpha$ $\beta$ - $\beta$ $\beta$ - $\gamma$ 2		N-N $\alpha$ -N $\alpha$ - $\alpha$ $\beta$ -N	$\alpha$ -N $\beta$ -N					
Gly 7				N- $\gamma$ N- $\delta$ $\alpha$ - $\epsilon$ 2 $\alpha$ 3- $\delta$ $\alpha$ - $\gamma$ 2	N- $\gamma$ 2 $\alpha$ - $\gamma$ 1	N-N N- $\alpha$ N- $\beta$ $\alpha$ - $\alpha$		N-N $\alpha$ - $\beta$					
Lys 8				N- $\gamma$ N- $\delta$	N-N	N- $\alpha$ N- $\beta$	N-N $\beta$ - $\alpha$		$\alpha$ -N $\beta$ -N $\delta$ 3-N	$\epsilon$ - $\gamma$ 2			
Trp 9		N- $\epsilon$ 3 $\beta$ 2- $\alpha$ $\beta$ - $\zeta$ $\beta$ 3- $\epsilon$ 3 $\epsilon$ 3-N $\epsilon$ 3- $\alpha$ $\epsilon$ 3- $\beta$ $\zeta$ - $\beta$		$\alpha$ - $\alpha$ $\delta$ 1- $\delta$ $\delta$ 1- $\epsilon$ $\epsilon$ 1- $\delta$ $\epsilon$ 1- $\epsilon$	$\alpha$ -N			N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\delta$ 3		$\alpha$ -N $\alpha$ - $\beta$ $\beta$ -N	$\epsilon$ 3-N $\epsilon$ 3- $\alpha$ $\zeta$ 3- $\alpha$		$\epsilon$ 1-H8 $\epsilon$ 1-H2' $\epsilon$ 3-H8 $\zeta$ -H8 $\zeta$ -H3' $\zeta$ 2-H2' $\eta$ 2-H8 $\eta$ 2-H1' $\eta$ 2-H2' $\eta$ 2-H3'
Ile 10		N- $\epsilon$ 3	N-N $\beta$ -N $\beta$ - $\delta$ 1 $\gamma$ 12-N	N- $\alpha$ $\gamma$ 2-N	$\gamma$ 1-N			$\gamma$ 2- $\epsilon$	N- $\alpha$ N- $\beta$ $\beta$ - $\alpha$		$\alpha$ -N $\beta$ -N $\gamma$ 2-N $\gamma$ 2- $\alpha$	$\delta$ 1- $\alpha$ $\delta$ 1- $\delta$ 2	
Lys 11	$\beta$ - $\alpha$	N- $\eta$ 2 N- $\alpha$ $\alpha$ - $\alpha$ $\alpha$ - $\delta$ 1 $\beta$ 2- $\alpha$ $\beta$ 3- $\eta$ 2 $\gamma$ - $\zeta$ 2 $\delta$ - $\epsilon$ 1	$\delta$ - $\zeta$ 2 $\delta$ - $\eta$ 2 $\epsilon$ - $\delta$ 1 $\epsilon$ - $\epsilon$ 1 $\epsilon$ - $\zeta$ 2 $\epsilon$ - $\eta$ 2 $\zeta$ - $\beta$ 2	$\alpha$ -N					N- $\epsilon$ 3 $\alpha$ - $\epsilon$ 3 $\alpha$ - $\zeta$ 3	N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\gamma$ 2 $\alpha$ - $\gamma$ 2		$\alpha$ -N $\alpha$ - $\beta$ $\beta$ -N $\gamma$ -N	
His 12	$\delta$ 2- $\beta$ $\delta$ 2- $\epsilon$ 1	N- $\alpha$ N- $\beta$ 2 $\delta$ 2- $\alpha$	$\beta$ - $\gamma$ 1 $\beta$ - $\delta$ 1 $\delta$ 2- $\beta$ $\delta$ 2- $\delta$ 1							$\alpha$ - $\delta$ 1 $\delta$ 2- $\delta$ 1	N- $\alpha$ N- $\beta$ N- $\gamma$ $\beta$ - $\alpha$ $\delta$ 2- $\alpha$		

En negro, los NOEs debidos a interacciones  $^1\text{HN}$ - $^1\text{HN}$ ,  $^1\text{HN}$ - $^1\text{Ha}$  o  $^1\text{Ha}$ - $^1\text{Ha}$ .

NOEs debidos a otro tipo de interacciones: en azul, por contactos hidrófobos y, en verde, por uniones de tipo catión- $\pi$ .

En rojo, los NOEs fruto de fenómenos de apilamiento entre los residuos aromáticos.



**Apéndice 8.** Gráficos de Ramachandran en los que se pueden observar los ángulos diédricos  $\Psi$  versus  $\Phi$  para los aminoácidos del péptido KIA $\beta$ W en muestras tanto sin ATP (izquierda), como con ATP (derecha). Observando que los valores de los ángulos para los distintos aminoácidos se encuentran en las regiones típicas de hojas  $\beta$ , a excepción de los residuos que componen el giro, podemos hacernos una idea de cuál será la estructura secundaria del péptido, la cual parece mantenerse al añadir el ATP. El porcentaje de aminoácidos en cada una de las regiones de los mapas figuran en las tablas de valores estadísticos correspondientes junto a los modelos estructurales calculados en cada caso (Figura 38 y Figura 47, respectivamente) y fueron obtenidos a partir de los datos de NMR adquiridos, empleando el módulo informático PROCHECK (Laskowski et al. 1996).